

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Dominika Kopalová

**Dlouhodobé sledování hladin ctDNA u pacientů s metastatickým
kolorektálním karcinomem pro včasný záchyt progresu či rekurence
onemocnění**

Long-term monitoring of ctDNA levels in patients with metastatic colorectal
cancer for early detection of progression or recurrence of the disease

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Dominika Kopalová

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. za odborné a zkušené rady, pádné připomínky a čas věnovaný podnětným diskusím. Také si velmi vážím její podpory nejen při psaní diplomové práce, ale také v pracovním a osobním životě. Dále mé velké díky patří Mgr. Renatě Ptáčkové, Ph.D. za veškerou pomoc jak ve formě konzultací a cenných rad, tak práce v laboratoři. Samozřejmě děkuji celému týmu v laboratoři Genomac za zaučení do používaných laboratorních metod a vytvoření přátelského a podporujícího prostředí. Zvláštní poděkování patří Ústřední vojenské nemocnici, Thomayerově nemocnici a Fakultní nemocnici v Motole za spolupráci a všem dárcům biologických vzorků za účast ve studii. V neposlední řadě také děkuji svým nejbližším za duševní, ale i finanční podporu, které se mi dostávalo během celého studia.

Abstrakt

Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) v periferní krvi pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem se jeví jako velmi slibný molekulárně-genetický marker, který poskytuje několik možných využití. Hladiny ctDNA kolísají v závislosti na přítomnosti a objemu nádorové masy (tumor burden) v těle pacienta, čehož se dá využít především pro včasný záchyt možné progresy, či rekurence onemocnění a při zhodnocení radikality operace, a to vše v rámci dlouhodobého sledování pacienta po operaci (tzv. follow-up). Díky minimální invazivitě vyšetření přítomnosti ctDNA z periferní krve (tzv. tekuté biopsie) je umožněno jeho opakované provádění v relativně krátkých časových intervalech. Z důvodu velmi nízkého zastoupení ctDNA v celkové volné DNA (cfDNA) v řádech jednotek až setin procent je stěžejním faktorem optimální metodika od izolace po dostatečně citlivou technologii detekce. V této diplomové práci se zabývám optimalizací izolačního procesu a analýzou ctDNA z nádorové tkáně a plazmy vybraných pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem v souvislosti s radikality operace a korelací s klinickým stavem pacienta.

Klíčová slova: cirkulující nádorová DNA, ctDNA, mutace, metastatický kolorektální karcinom, mCRC, follow-up, radikality operace, izolace

Abstract

Circulating tumor DNA (ctDNA) in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer appears to be a promising molecular marker that provides various applications. ctDNA levels vary depending on the presence, alternatively on the volume of tumor mass within patient's body, which can be used primarily for early detection of disease progression or recurrence and moreover for evaluating radicality of surgical treatment, all within long-term postoperative follow-up of the patient. Due to minimal invasivity of ctDNA analysis from peripheral blood (so-called liquid biopsy), it is possible to perform it repeatedly at relatively short time intervals. On account of very low fraction of ctDNA in total cell-free DNA (cfDNA) ranging between units and hundreds of percent, the key factor is optimal methodology covering all steps from the isolation process to a sufficiently sensitive detection technology. In this thesis I focus on an optimization of isolation process and analysis of ctDNA obtained from tumor tissue and plasma of selected patients with metastatic colorectal cancer in connection with surgical radicality and correlation with a clinical status of the patients.

Key words: circulating tumor DNA, ctDNA, mutations, metastatic colorectal cancer, mCRC, follow-up, surgical radicality, isolation

Seznam zkratek:

APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
AS-PCR	<i>Allele-Specific PCR</i> , alelicky specifická PCR
BEAMing	<i>Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics</i>
BCHT	kombinovaná biologická a chemoterapeutická léčba
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i> , B-Raf protoonkogen
CA 19-9	<i>Cancer Antigen 19–9</i> , tumorový antigen 19-9
CAPPSeq	<i>CAnceR Personalized Profiling by deep Sequencing</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i> , karcinoembryonální antigen
cfDNA	<i>Circulating Cell-free DNA</i> , cirkulující volná DNA
COLD-PCR	<i>Co-amplification at lower denaturation temperature</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer</i> , kolorektální karcinom
CT	<i>Computed Tomography</i> , výpočetní tomografie
CTC	<i>Circulating Tumor Cell</i> , cirkulující nádorová buňka
ctDNA	<i>Circulating Tumor DNA</i> , cirkulující nádorová DNA
DCE	<i>Denaturing Capillary Electrophoresis</i> , denaturační kapilární elektroforéza
ddPCR	<i>droplet digital PCR</i> , droplet digitální PCR
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , deoxyribonukleotidová kyselina
dPCR	<i>digital PCR</i> , digitální PCR
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kyselina ethylendiamintetraoctová
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i> , familiární adenomatózní polypóza
GAP	<i>GTP Activating Protein</i> , GTP aktivující protein
GDP	<i>Guanosine-diphosphate</i> , guanosindifosfát
GTP	<i>Guanosine-triphosphate</i> , guanosintrifosfát
HET	heteroduplex
HOM	homoduplex
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
CHT	chemoterapeutická léčba
inc.	„inconclusion“

KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
MAF	<i>Mutant Allele Fraction</i> , frakce mutovaných alel
MAPK/ERK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase/ Extracellular signal-regulated Kinase</i> , proteinkináza aktivovaná mitogenem/kináza regulovaná extracelulárním signálem
mCRC	<i>Metastatic Colorectal Cancer</i> , metastatický kolorektální karcinom
MPC	izolační kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I
MR	izolační kit Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> , magnetická rezonance
NGS	<i>New Generation Sequencing</i> , sekvenování nové generace
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
PET/CT	<i>Positron Emission Tomography/ Computed Tomography</i> , pozitronová emisní tomografie spojená s výpočetní tomografií
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PFS	<i>Progression Free Survival</i> , přežití bez progresu
PI3K	<i>Phosphoinositide 3- kinase</i> , fosfatidylinositol- 3 -kináza
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha</i> , fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázová katalytická podjednotka alfa
PME	<i>Polymer Mediated Enrichment</i> , polymerem zprostředkované nabohacení
QCNA	izolační kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit
qPCR	<i>real-time PCR</i> , PCR v reálném čase
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i> , červená krvinka
Safe-SeqS	<i>Safe-Sequencing System</i>
SD	<i>Standard deviation</i> , směrodatná odchylka
TP 53	<i>Tumor Protein 53</i> , tumorový protein 53
UI	<i>Unique Identifier</i> , unikátní identifikátor
UZ	<i>Ultrasonography</i> , ultrazvuk
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> , celogenomové sekvenování
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i> , celoexomové sekvenování

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Etiologie CRC	10
1.2	Metastatický CRC a jeho prognóza	10
1.2.1	Nejčastěji mutované geny	10
1.2.2	Charakteristika a prognóza mCRC	13
1.2.2.1	Radikalita operace	13
1.3	Charakteristika ctDNA	14
1.3.1	CtDNA vs. cfDNA	14
1.3.2	Uvolňování do krevního řečiště	14
1.3.3	Chemoterapie a ctDNA	15
1.4	Vyšetření ctDNA	16
1.4.1	Izolační metody	17
1.4.2	Metody analýzy ctDNA	19
1.5	Klinická využití ctDNA	21
1.5.1	Tekutá biopsie	21
1.5.2	Sledování dynamiky nádorového onemocnění	22
1.5.2.1	Dlouhodobé pooperační sledování pacientů (follow-up)	23
1.5.2.2	Sledování odpovědi na léčbu a odhad prognózy	24
2	Cíle a hypotézy	26
3	Materiál a metody	27
3.1	Soubor pacientů	27
3.1.1	Dlouhodobé sledování (follow-up)	27
3.2	Vzorky	27
3.3	Metody	28
3.3.1	Izolace DNA ze vzorku nádorové tkáně	28
3.3.2	Izolace a přečištění cfDNA z plazmy	29
3.3.2.1	Přečištění cfDNA	34
3.3.3	PCR s následnou tvorbou heteroduplexů	34
3.3.3.1	PCR reakce nádorové DNA a cfDNA	36
3.3.3.2	Tvorba heteroduplexů	36
3.3.4	Denaturační kapilární elektroforéza	37

3.3.5	Vyhodnocení výsledků	39
3.3.5.1	Vyhodnocení elektroferogramů	39
3.3.5.2	Výpočet procentuálního zastoupení mutované frakce	40
4	Výsledky	41
4.1	Optimalizace izolace a zachytu ctDNA	41
4.1.1	Porovnání izolačních kitů	41
4.1.2	Optimalizace PCR reakce	43
4.2	Analýza klinických vzorků	44
4.2.1	Mutační analýza tkáňových vzorků	44
4.2.2	Záchyt ctDNA	45
4.2.3	Radikalita operace vs. ctDNA	45
4.2.4	Follow-up pacientů	46
5	Diskuse	48
6	Závěr	52
7	Seznam použitých zdrojů	53
7.1	Seznam citované literatury	53
7.2	Seznam internetových zdrojů	63

1 Úvod

1.1 Etiologie CRC

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí, přičemž kolorektální karcinom (CRC), tedy maligní nádor tlustého střeva a konečníku, se řadí na třetí místo nejčastějších lidských malignit a zároveň je to nejčastější typ rakoviny v rámci gastrointestinálního traktu. U mužů je CRC třetím nejčastěji diagnostikovaným typem rakoviny (po rakovině plic a prostaty), zatímco u žen se řadí na druhé místo (po rakovině prsu). V roce 2018 bylo na celém světě diagnostikováno 1,8 milionu nových případů a zemřelo okolo 861 000 pacientů (Bray et al., 2018). Incidence (nově diagnostikované případy onemocnění za rok) i mortalita (úmrtnost) se v různých částech planety výrazně liší, zejména v závislosti na vyspělosti státu. Obecně se dá říci, že incidence i mortalita kolorektálního karcinomu stále stoupá, ačkoli v rozvinutých státech pozorujeme mírný trend klesání mortality. To je pravděpodobně výsledek především screeningových programů a s tím souvisejícího včasného odhalení CRC a dále také pokrokem v diagnostických a léčebných postupech (Arnold et al., 2016). Česká republika bohužel zaujímá v celosvětovém srovnání incidence CRC přední místa. Ročně je diagnostikováno okolo 8 000 pacientů, přičemž přibližně polovina z nich na toto onemocnění zemře (URL1).

1.2 Metastatický CRC a jeho prognóza

1.2.1 Nejčastěji mutované geny

Za rozvoj kolorektálního karcinomu jsou zodpovědné jak faktory environmentální, tak faktory genetické, přičemž klíčové jsou mutace v tumor supresorových genech a protoonkogenech, které ve výsledku způsobují transformaci epiteliálních kmenových buněk střeva v buňky nádorové vymykající se regulaci. Tyto buňky pak mají mj. schopnost neomezené proliferace, šíření do vzdálených tkání a metastazování (Testa et al., 2018). Nejčastěji mutované tumor supresorové geny, které se zároveň využívají jako diagnostické markery, jsou *APC* a *TP53*.

Gen *APC* (*Adenomatous Polyposis coli*) se nachází na dlouhém raménku 5. chromozomu v oblasti 5q21–22. Skládá se z 15 exonů a jeho velikost je přibližně 108 kbp (Groden et al., 1991). Tento gen je nejčastěji mutovaným genem v rámci buněk tlustého střeva, přičemž přítomnost mutace byla detekována u 51 % vzorků nádorové tkáně dle databáze Cosmic (URL2). Nejčastějším typem somatických mutací jsou tzv. nonsense substituce (60 %) nacházející se zejména v oblasti mutačních klastrů, což je krátká oblast v exonu 15 zahrnující kodóny 1286-1513 (Mori et al., 1992; URL3). Produktem genu *APC* je protein APC, který ovlivňuje řadu buněčných funkcí, jako je například buněčná migrace a diferenciaci, aktivace apoptózy a buněčné dělení (McCartney and Näthke, 2008). Ve zdravé tkáni je tento protein součástí multi-proteinového komplexu, který reguluje Wnt signální dráhu tím, že značí β - katenin k degradaci v proteasomech (Polakis, 2012). V případě, že buňky mají mutovaný gen *APC*, dochází k hromadění β -kateninu v jádře, kde funguje v komplexu s dalšími molekulami jako transkripční aktivátor genů účastnících se řízení buněčného cyklu, což následně vede k zvýšené proliferaci buněk a transformaci zdravé tkáně v adenom (Stamos and Weis, 2013). Přítomnost specifických zárodečných mutací v genu *APC* v tlustém střevě (včetně konečníku) způsobuje dědičné genetické onemocnění zvané familiární adenomatózní polypóza (FAP), které se postupem času rozvine v kolorektální karcinom (Dow et al., 2015).

Gen *TP53* (Tumor Protein 53) je lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu v oblasti 17p13.1, je dlouhý přibližně 20 kbp a obsahuje 12 exonů (URL4). Řadí se na druhé místo nejčastěji mutovaných genů v rámci buněk tlustého střeva po genu *APC*, kdy mutovaný byl u 46 % vzorků nádorové tkáně dle databáze Cosmic (URL2). Nejčastějším typem somatických mutací jsou tzv. missense substituce (55 %), které se nejvíce vyskytují v pěti kodónech, a to 175 (exon 5), 245 (exon 7), 248 (exon 7), 249 (exon 7) a 273 (exon 8), (Hainaut et al., 1997; URL5). Somatické mutace v tomto genu nejsou typické jen pro kolorektální karcinom, ale jsou velmi časté u většiny nádorových onemocnění (Hollstein et al., 1991). Produktem genu *TP53* je vazebný protein p53, který má zejména uplatnění v řízení buněčného cyklu, v odpovědi na buněčný stres a poškození DNA. Tento protein ve zdravých buňkách reguluje na transkripční úrovni geny zapojené v apoptóze, reparačních systémech buňky, zástavě buněčného cyklu a senescenci buněk, čímž zachovává stabilitu genomu (Riley et al., 2008). Pakliže jedinec zdědí zárodečnou mutaci v genu *TP53*, má velkou predispozici k rozvoji Li-Fraumeni syndromu projevujícího se mj. karcinomem prsu, sarkomy a jinými neopláziemi (Li et al., 1988).

Dalšími vyšetřovanými geny u kolorektálního karcinomu jsou *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA*. Patří k tzv. protoonkogenům, které se následkem bodových mutací či genových amplifikací mění v nádorových buňkách na tzv. onkogeny postrádající schopnost vnější regulace a jejich působením dochází k nekontrolovanému dělení. Na rozdíl od tumor supresorových genů, kde je potřeba pro jejich inaktivaci poškození obou alel, u protoonkogenů stačí přítomnost mutace na jedné alele, aby došlo k proměně na onkogeny (Osborne, 2004).

Gen ***KRAS*** (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) se nachází na krátkém raménku 12. chromozomu v oblasti 12p12.1, obsahuje 6 exonů a je dlouhý přibližně 45 kbp (URL6). Je třetím nejčastěji mutovaným genem u pacientů s CRC. Mutace byla detekována u 34 % vzorků nádorové tkáně dle databáze Cosmic (URL2). *KRAS* onkogen patří do rodiny savčích Ras genů spolu s geny *NRAS* a *HRAS* a jeho produktem je p21-ras protein nacházející se v cytoplazmatické membráně. Tento GTP-vazebný protein reguluje dráhu signální transdukce spuštěním proteinkinázové kaskády, která vede k aktivaci jaderných transkripčních faktorů a stimulaci buněčného dělení nebo inhibici apoptózy. Vyskytuje se ve dvou stavech, a to v inaktivním stavu ve vazbě s GDP a v aktivním stavu ve vazbě s GTP (Bourne et al., 1991; Mu, 2004). Typické mutace způsobující změnu Ras protoonkogenu na onkogen jsou tzv. missense substituce (99,7 %) detekované především v kodónech 12, 13 (exon 2) a 61 (exon 3). Přítomnost těchto mutací zapříčiňuje to, že se protein stane rezistentním k GTP hydrolýze GAPs proteiny (GTPase Activating Proteins), tím pádem dochází k jeho permanentní aktivaci, což má za následek nekontrolovanou stimulaci buněčné proliferace a inhibici apoptózy (Schubbert et al., 2007; URL7).

Gen ***BRAF*** se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu v oblasti 7q34, obsahuje 23 exonů a je dlouhý cca 211 kbp (URL8). Dle databáze Cosmic byla přítomná mutace u 10 % vzorků nádorové tkáně pacientů s CRC (URL2). Produktem je protein patřící do RAF rodiny serin/threonin kináz a jeho úloha je v regulaci MAPK/ERK signální dráhy ovlivňující mj. proliferaci a diferenciaci buněk. Nejčastěji detekovanou mutací u pacientů s CRC je V600E v exonu 15, která způsobuje konstitutivní kinázovou aktivitu proteinu, a tím nekontrolovanou proliferaci buněk vedoucí k rozvoji nádoru (Davies et al., 2002).

Gen ***PIK3CA*** (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 3 v oblasti 3q26.32, obsahuje 23 exonů a jeho přibližná délka je 92 kbp (URL9). Tento gen byl dle databáze Cosmic mutován u 15 % vzorků nádorové tkáně od pacientů s CRC (URL2). Jeho produktem je p110 α protein tvořící

katalytickou podjednotku enzymu fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). Ta patří mezi lipidové kinázy podporující různé buněčné procesy včetně proliferace a přežití buněk. V případě, že je gen mutován, a to nejčastěji v kodónech 542, 545 (exon 9) a 1042 (exon 20), dochází k permanentní aktivaci kinázové funkce a k transformaci na onkogen (Samuels, 2004; Samuels et al., 2005).

1.2.2 Charakteristika a prognóza mCRC

Přibližně 50 % pacientů s kolorektálním karcinomem má již v době diagnózy přítomné synchronní metastázy, tzn. vyskytující se současně s primárním tumorem, případně u nich dochází k rozvoji metachronních metastáz v rámci několika let po odoperování primárního tumoru (Benešová et al., 2019). Nejčastějším místem vzniku metastáz jsou játra (70 %) a plíce. Metastázy v plicích jsou častější u pacientů s karcinomem rekta (30 %) než u pacientů s karcinomem tlustého střeva (17 %), což je dáno anatomicky průnikem nádorových buněk skrze dolní rektální žílu do duté žíly, a následně krevním tokem až do plicní tepny. Mezi další místa metastáz u pacientů s diagnostikovaným karcinomem rekta patří kosti (5 %) a nervový systém (1 %). U karcinomu tlustého střeva je rovněž častým místem výskytu pobřišnice (23 %). Kromě hematogenního rozsevu nádorových buněk do ostatních orgánů existuje ještě tzv. lymfogenní rozsev skrze lymfatický systém vyúsťující v rozvoj metastáz ve vzdálených mízních uzlinách (Hong et al., 2012; Holch et al., 2017). Prognóza pacientů je pak ovlivněna jak synchronitou, přičemž výskyt synchronních metastáz se považuje za horší prognostický marker, tak lokalizací a počtem přítomných metastáz, resp. možností jejich chirurgického odstranění (resektabilitou), (Ghiringhelli et al., 2014; Vatandoust, 2015). Kompletní chirurgické odstranění, tedy odstranění veškeré nádorové tkáně, ideálně v kombinaci s perioperační chemoterapií, je jediným možným způsobem vyléčení pacienta a na úspěšnosti jeho provedení závisí jeho prognóza. Z tohoto důvodu se hodnotí tzv. radikalita operace (Koerkamp et al., 2017).

1.2.2.1 Radikalita operace

Radikalita chirurgického odstranění (resekce) nádorových ložisek je po operaci vyhodnocována patologem na základě vyšetření okrajů resektátu (odstraněné tkáně) a má tři kategorie. Kompletní resekce bez přítomných makroskopických i mikroskopických nádorových ložisek je označována jako kurativní resekce R0 a dle patologa nejsou

v resekčním okraji žádné nádorové buňky. V případě, že se jedná o neúplnou mikroskopickou resekci a patolog potvrdí přítomnost nádorových buněk v resekčním okraji, označuje se jako R1. Poslední kategorií je radikalita resekce R2, při které nejsou během operace odstraněna všechna makroskopická ložiska. Jestliže zůstal po operaci v těle pacienta makroskopický zbytek primárního tumoru, patolog označí radikalitu resekce jako R2a. V případě, že nebyla odstraněna vzdálená metastáza, jedná se o radikalitu resekce R2b. Radikalita resekce R2c, označuje přítomnost jakýchkoli makroskopických reziduí po operaci, ať už primárního tumoru nebo metastáz (Wittekind et al., 2009).

1.3 Charakteristika ctDNA

Jako cirkulující nádorová DNA (ctDNA) se označují molekuly fragmentované nebuněčné DNA kolující v krevním řečišti, které byly poprvé popsány v séru pacientů s nádorovým onemocněním v roce 1977 (Leon et al., 1977).

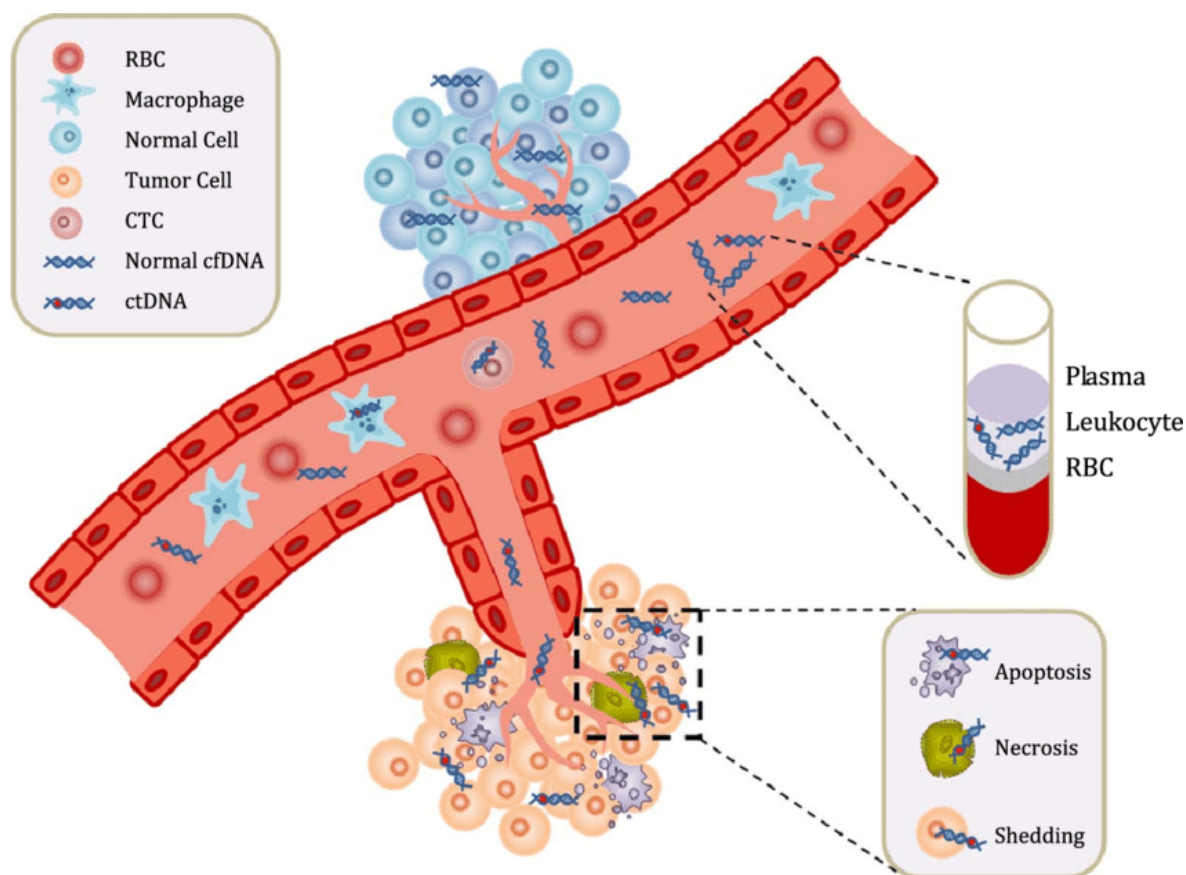
1.3.1 CtDNA vs. cfDNA

Je nutné rozlišovat dva pojmy, a to cirkulující nádorovou DNA (ctDNA) a volnou cirkulující DNA (cfDNA). cfDNA je uvolňována do krevního řečiště nejen buňkami nádorovými, ale také zdravými či zánětlivými, a vyskytuje se tedy i u osob bez nádorového onemocnění. K jejich rozlišení slouží skutečnost, že ctDNA obsahuje mutace přítomné pouze v genomu nádorových a prekancerózních buněk, které v genomu nenádorových buněk stejného jedince přítomné nejsou. Díky ní známe přesný otisk nádorového genomu včetně nádorově specifických somatických mutací (Diaz and Bardelli, 2014). ctDNA tvoří velmi malou frakci na pozadí celkové cfDNA pohybující se až v setinách procent, což je důvodem složitosti její detekce (Diehl et al., 2005).

1.3.2 Uvolňování do krevního řečiště

Přesný mechanismus uvolňování ctDNA do krevního řečiště je stále předmětem zkoumání. Nicméně se uvažuje o několika pravděpodobných mechanismech, jako jsou pasivní uvolňování apoptickými a nekrotickými buňkami, aktivní uvolňování živými nádorovými buňkami skrze membránové váčky (exosomy) a lipoproteonukleotidové komplexy

(virtosomy), fagocytóza a exocytóza (Thierry et al., 2016). V závislosti na původu ctDNA se liší délka jejích fragmentů uvolňovaných do krevního řečiště. Klasicky se vyšetřují fragmenty délky 145-180 bp, což odpovídá délce DNA navinuté okolo nukleozomů a uvolněné při apoptóze (Jahr et al., 2001). V práci Moulier et al. (2018) zmapovali pomocí metody Low-pass Whole Genome Sequencing délku ctDNA fragmentů u 344 vzorků plazem od pacientů s rakovinou a zaznamenali nabohacení ctDNA o délce fragmentů 90-150 bp a 250-320 bp. Velikost fragmentů je tedy velmi heterogenní. ctDNA uvolněná z nekrotických buněk může mít délku větší než 10 000 bp (Jahr et al., 2001).



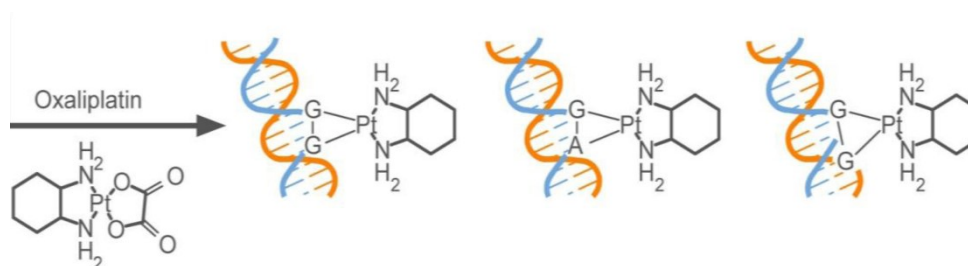
Obrázek 1: Molekuly kolující v krevním řečišti a možné způsoby uvolňování ctDNA. Převzato z: Hahn, Nussenzweig, Maughan, & Agarwal, 2019.

RBC ... červené krvinky, CTC ... cirkulující nádorové buňky

1.3.3 Chemoterapie a ctDNA

Jelikož pacienti s mCRC mají ve většině případů předepsanou chemoterapeutickou léčbu, jejíž mechanismus účinku je nejčastěji inaktivace replikace DNA v nádorových buňkách, nastává otázka, zdali nemá nějaký dopad na ctDNA a zda následně neovlivňuje možnost její

detekce. Dosud na toto téma nebyla publikována žádná studie, a tak se zde nabízí zajímavá oblast pro výzkum. Protinádorové léky, které se nejvíce používají k léčbě CRC, jsou 5- fluorouracil v kombinaci s kyselinou folinovou (leukovorinem), kapecitabin (Xeloda) a oxaliplatinou. Léčba oxaliplatinou v kombinaci s fluorouracilem a leukovorinem (režim Folfox) patří mezi nejfrekventovanější a může mít vliv na kvalitu ctDNA a možnost její detekce. Důvod je ten, že oxaliplatinu je v těle pacienta metabolizována na formu schopnou kovalentně se vázat na atom dusíku purinových bází a tvořit můstky mezi vlákny DNA (Woynarowski et al., 2000; Zavoral et al., 2016). To pak může vést ke znemožnění nasednutí polymerázy a inhibici PCR reakce.



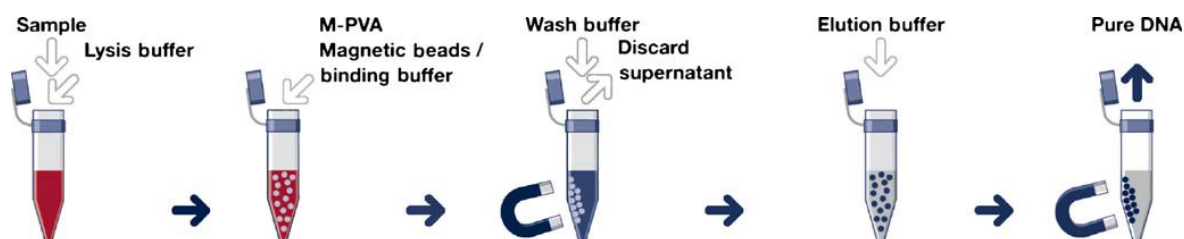
Obrázek 2: Znázornění vazby oxaliplatiny na DNA. Cytotoxický efekt oxaliplatiny spočívá v navázání platiny na 2 dusíkaté báze v řetězci DNA a následné tvorbě vazby mezi nimi uvnitř řetězce nebo mezi řetězci, což má za následek inhibici replikace DNA, a nakonec smrt nádorové buňky. Převzato z: Kline & El-Deiry, 2013.

1.4 Vyšetření ctDNA

Jak jsem zmínila výše, vzhledem k velmi nízké koncentraci ctDNA v celkové cfDNA, zvláště v časných stádiích onemocnění, je její detekce velkou výzvou kladoucí vysoké nároky na používanou metodiku. Existují dva hlavní přístupy při vyšetření ctDNA, přičemž první se dá uplatnit pouze při dostupnosti nádorové tkáně a spočívá v její mutační analýze, kdy se vyšetřuje panel konkrétních mutací v genech typických pro dané nádorové onemocnění a posléze se přítomnost zachycených mutací cíleně sleduje v cfDNA izolované z plazmy pacienta. K druhé variantě se přistupuje při nedostupnosti nádorové tkáně a zahrnuje mutační analýzu panelu genů přímo v cfDNA z plazmy, což je o poznání náročnější způsob vyžadující techniky s vysokou citlivostí i specifitou (Belic et al., 2015).

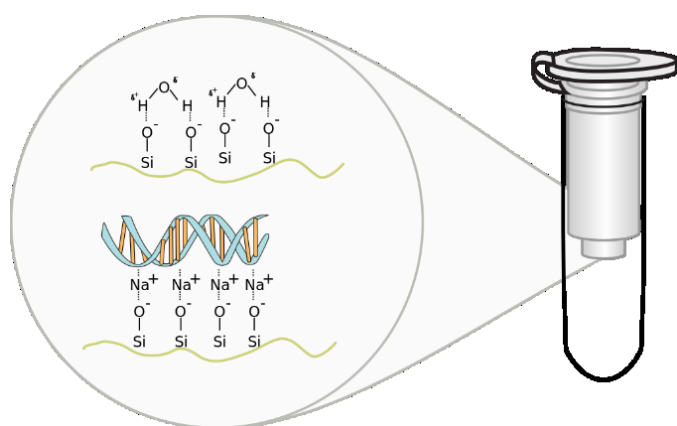
1.4.1 Izolační metody

Prvním z klíčových faktorů pro úspěšnou analýzu je izolace cfDNA z plazmy s co největším nabožením o ctDNA. K tomu bylo vyvinuto již několik metod lišících se způsobem získání cfDNA. Příkladem jsou izolační soupravy fungující na principu navázání negativně nabitých fosfátových zbytků v DNA molekule na silikagelovou matrix. Prvním uspořádáním je její umístění na povrchu magnetických kuliček, které lze, při aplikaci magnetického pole (např. pomocí permanentního magnetu), po navázání DNA a promytí elučním pufrem, snadno oddělit. Výhoda je, že se nemusí použít centrifugace, u které je riziko degradace nukleové kyseliny (Berensmeier, 2006). Kromě silikagelové matrix se dají k izolaci využít ještě další materiály jako např. polyvinylalkohol nebo polystyren (Ugelstad et al., 1992; Oster, Parker, & Brassard, 2001).



Obrázek 3: Schematický postup izolace DNA za použití technologie magnetických kuliček. Převzato z: Berensmeier, 2006.

Druhým uspořádáním je umístění silikagelové matrix v podobě membrány na povrchu kolonky, která se po zachycení DNA opakovaně promývá a následně se z ní DNA eluuje.



Obrázek 4: Znárodnění vazby DNA na silikagelovou membránu umístěnou v kolonce. Převzato z: URL10

Dalšími možnými metodami izolace cfDNA jsou tzv. Polymer-Mediated Enrichment (PME) spočívající v zachycení cfDNA na speciální polymer a fenol-chloroformová extrakce s následnou ethanolovou precipitací (Fong, Zhang, Lim, Eu, & Liu, 2009; Sorber et al., 2017).

Několik studií porovnávalo všechny tyto metody z hlediska výtěžku cfDNA, distribuce velikosti fragmentů a kvality DNA pro následné analýzy. Müller et al. (2008) ve své studii porovnával fenol-chloroformovou metodu a komerční kit fungující na principu zachycení DNA na kolonku se silikagelovou membránou QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). Zaznamenali vyšší výtěžek cfDNA použitím fenol-chloroformové metody. Avšak takto izolovaná DNA byla velmi znečištěná, což mělo negativní efekt na následné analýzy. Naopak u komerčního kitu byla kvalita DNA lepší, nicméně vyizolovaná frakce cfDNA obsahovala především fragmenty o vyšší molekulární hmotnosti, což znamená, že došlo ke ztrátě fragmentů o nižší molekulární hmotnosti, u kterých se předpokládá, že obsahují mutace odvozené z nádorové DNA. Obdobný výsledek zaznamenali i v další studii, ve které porovnávali ten samý komerční kit s modifikovanou Millerovou metodou izolace vysolováním kombinovanou s fenol-chloroformovou extrakcí. Opět zaznamenali vyšší výtěžek cfDNA u metody izolace vysolováním kombinované s fenol-chloroformovou extrakcí, což si stejně jako v předchozí studii vysvětlovali možnou částečnou ztrátou fragmentů DNA kratších než 150 bp u použití kolonky se silikagelovou membránou, jelikož na ní efektivněji dochází k vazbě delších fragmentů. Nevýhodou metody vysolování je ale časová náročnost oproti použití komerčního kitu (Schmidt, Weickmann, Witt, & Fleischhacker, 2005).

Další studie porovnávaly různé komerční izolační kity. Například ve studii Pérez-Barrios et al. (2016) porovnávali jeden z nejpoužívanějších manuálních izolačních kitů na principu kolonky QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (**QCNA**) od firmy Qiagen (Německo) se dvěma dalšími, a to s MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (**MPC**) (Roche Diagnostics, Německo) a Maxwell[®] RSC ccfDNA Plasma Kit (**MR**) (Promega, USA), které jsou už automatizované a využívají technologie magnetických částic vážící DNA. U kitu MR navíc stačí pouze přidat vzorek plazmy do již předpřipravených kazet naplněných reagensy a magnetickými částicemi a spustit protokol. K dispozici měli vzorky 57 plazem od pacientů s rakovinou a jejich cílem bylo porovnat výtěžek a velikost získaných fragmentů cfDNA. Vstupní objem plazmy byl u všech tří kitů stejný, a to 1 ml.

K analýze cfDNA využili metodu dPCR (digitální PCR) a její koncentraci měřili pomocí fluorometru Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Jejich výsledky ukázaly, že při použití kitů MPC a MR existuje významný rozdíl ve výtěžku cfDNA ve prospěch MR. Při porovnání QCNA a MR byl výtěžek srovnatelný, nicméně díky automatizaci má MR výhodu v rychlosti a jednoduchosti provedení. Dále také pozorovali, že výtěžek cfDNA souvisí se stádiem onemocnění, a že testované kity MPC a MR vykazovaly odlišnosti ve výtěžnosti mono-, di- a trinukleozomálních DNA fragmentů a v souvislosti s tím naznačují, že frakce cfDNA s nižší molekulovou hmotností často obsahuje mutace odvozené z nádorové DNA. Další srovnání kitů QCNA a MR provedli Kloten et al. (2017), kdy analyzovali 38 vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem. Velikost fragmentů cfDNA hodnotili pomocí bioanalyzátoru Agilent 2100 a její koncentraci měřili fluorometrem Qubit. Pozorovali zajímavý výsledek, že při použití kitu QCNA se silikagelovou membránou spíše dochází k nabohacení fragmentů cfDNA s vyšší molekulární hmotností, a naopak při využití metody MR a zachycení cfDNA na magnetické částice dochází k efektivnější izolaci krátkých cfDNA fragmentů, a zdá tedy pro izolaci vhodnější. Navíc potvrdili i výsledek studie Pérez-Barrios, že množství cfDNA souvisí se stádiem onemocnění, kdy pacienti se vzdálenými metastázemi měli největší výtěžek cfDNA.

1.4.2 Metody analýzy ctDNA

Dalším klíčovým faktorem pro záchyt ctDNA je dostatečně citlivá detekční metoda. Jak již bylo řečeno, první strategií při analýze ctDNA je tzv. cílený přístup vyžadující znalost nádorově-specifických mutací z primárního tumoru, aby se poté jejich přítomnost mohla sledovat v periferní krvi pacienta pomocí ctDNA. Zahrnuje techniky založené především na real-time PCR (qPCR), digitální PCR (dPCR) a sekvenování nové generace (NGS). Velkou výhodou tohoto přístupu je vysoká citlivost (až 0,01 %) i vysoká specifita. Druhou strategií je tzv. necílený přístup využívající metody celogenomového (WGS) a celoexomového (WES) sekvenování, které se zaměřují na detekci změn počtu kopií nebo bodových mutací napříč celým genomem. Díky tomu dokáží identifikovat nové změny v nádorovém genomu. Výhodou tohoto přístupu je absence potřeby předem znát genom primárního tumoru, nicméně nevýhodou je celkově nízká citlivost (5-10 %), (Elazezy and Joosse, 2018).

V rutinní praxi se nejčastěji k analýze ctDNA využívají qPCR a dPCR. Real time PCR je rychlá a levná metoda spočívající v klasické PCR amplifikační reakci, která navíc umožňuje zaznamenávat nárůst PCR produktu v reálném čase, a to díky fluorescenci emitované v průběhu jednotlivých reakčních cyklů, kdy se používají speciální fluorescenční sondy vážící se na cílovou sekvenci obsahující mutaci (Heid et al., 1996). Citlivost této metody je 10-20 %, tzn. umí detekovat mutované alely, pokud je jejich zastoupení na pozadí nemutované DNA 10–20 %, což je pro většinu klinických aplikací nedostatečné. Z tohoto důvodu byly vyvinuty další metody založené na qPCR, které mají citlivost vyšší, jako jsou například AS-PCR (Allele-Specific) s citlivostí v rozmezí 1-2 % a COLD-PCR (Co- amplification at lower denaturation temperature) s citlivostí 0,05 % (Rapisuwon, Vietsch, & Wellstein, 2016).

Ještě lepší z hlediska citlivosti a specifity jsou metody založené na digitální PCR, což je robustní metoda detekce bodových mutací v ctDNA zahrnující droplet digitální PCR (ddPCR) a metodu BEAMing (Beads, Emulsions, Amplification, and Magnetics). Metoda droplet digitální PCR spočívá v rozdělení analyzovaného vzorku DNA do tisíců až milionů kapiček olejové emulze, přičemž každá kapička obsahuje buď mutované, nebo nemutované řetězce DNA. Po vytvoření jsou kapičky přeneseny do jednotlivých jamek v PCR mikrotitrační destičce umístěné v termocykléru, ve kterých jsou již potřebné reagensie pro průběh PCR včetně detekčních fluorescenčních sond, a následně probíhá na každé kapičce zvlášť amplifikace klasickou PCR reakcí. Vyhodnocení se poté uskutečňuje pomocí detektoru, tzv. microdroplet readeru, který jednotlivé jamky vyhodnocuje na základě jejich fluorescenčního zbarvení na ty s mutovanou a na ty s nemutovanou DNA. Výhodami této metody jsou cenová dostupnost a vysoká citlivost při detekci mutací dosahující 0,1 % (Brunetto et al., 2014; Elazezy and Joosse, 2018). Při metodě BEAMing dochází nejprve k naamplifikování DNA pomocí PCR. Následně se k naamplifikovaným molekulám DNA přidají magnetické kuličky, na jejichž povrchu jsou specifické biotinylované primery a proběhne emulzní dPCR, přičemž na každé kuličce je jedna molekula DNA, která se amplifikuje a vznikají tak tisíce jejích kopií. Nakonec se přidají fluorescenční sondy, které hybridizují s amplifikovanou DNA v místě mutace, a průtokovou cytometrií se rozdělí kuličky podle přítomnosti mutované DNA, nebo nemutované DNA. Tato metoda dosahuje ještě větší citlivosti než ddPCR, a to až 0,01 %, avšak její nevýhodou je komplikovaný postup práce a vysoká cena znemožňující její využití v rutinní klinické praxi (Diehl et al., 2005; Li et al., 2006; Taniguchi et al., 2011).

Další možnou technologií analýzy ctDNA je sekvenování nové generace spočívající v paralelní analýze několika milionů krátkých sekvencí DNA, které se dále přiřazují k referenčnímu genomu. Již bylo vyvinuto několik metod založených na hlubokém sekvenování, které mají zvýšenou citlivost, jako jsou například CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing) a Safe-Seqs (Elazezy and Joosse, 2018). Metoda CAPP-Seq vykazuje citlivost až 0,02 % a slouží k detekci a kvantifikaci ctDNA. Využívají se k tomu tzv. selektory z biotinylovaných DNA oligonukleotidů, které jsou komplementární k předem definovaným mutovaným oblastem typickým pro daný typ rakoviny. Ke zjištění konkrétních mutací přítomných u daného pacienta se nejprve selektory přidají k nádorové DNA z tkáně a k normální DNA, a poté se vybrané selektory přidají k ctDNA ke kvantifikaci těchto mutací (Newman et al., 2014). Metoda Safe-SeqS (Safe-Sequencing System) využívá pro identifikaci vzácných mutací unikátní identifikátory (UIs), což jsou sekvence připojované ke každé templátové molekule DNA. Takto označené templátové molekuly jsou amplifikovány, čímž se vytvoří skupiny sekvencí rozdělených podle připojeného UI. Dále se amplifikační produkty opakovaně sekvenují, a pokud je ve více jak 95 % PCR produktů se stejným UI přítomná stejná změna, je považována za mutaci, a nikoliv za sekvenační chybu. Díky tomu tedy můžeme rozlišit, co je původní mutace v nádorové DNA a co je sekvenační chyba. Citlivost této metody je 0,1 % (Kinde et al., 2011; Tie et al., 2015).

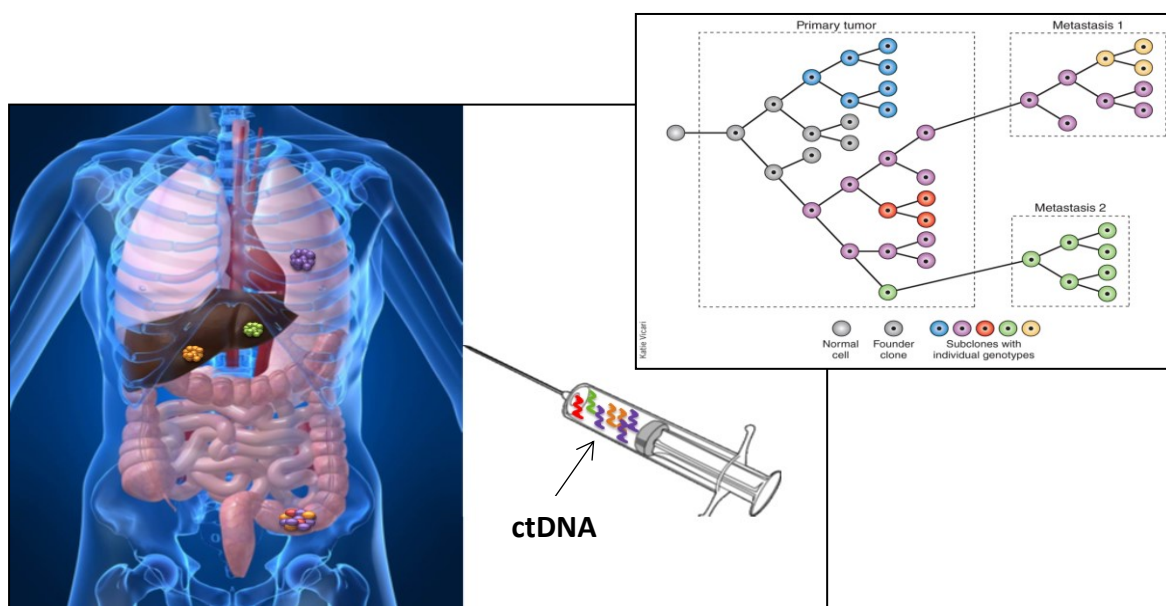
1.5 Klinická využití ctDNA

Hlavní klinická využití ctDNA u pacientů s mCRC se dají rozdělit do dvou oblastí. První z nich je vyšetřování nádorových mutací ze vzorku plazmy či séra při nedostupnosti tkáňového vzorku, tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy). Druhou oblastí je využití ctDNA jakožto nástroje pro sledování dynamiky nádorového onemocnění, kdy hladiny ctDNA odrážejí celkovou tumorovou masu v těle, tzv. tumor burden.

1.5.1 Tekutá biopsie

K získání ctDNA z periferní krve pacienta s mCRC, u kterého nelze získat vzorek tkáně tumoru, a tím pádem zjistit mutační profil, slouží tzv. tekutá biopsie, která vyšetření nádorových mutací umožní. Její velkou výhodou je minimální invazivita, kdy na rozdíl od

klasické tkáňové biopsie tolik nezatěžuje pacienta, jelikož spočívá v klasickém odběru krve umožňujícím její opakované provádění po krátkých časových intervalech (měsících či dokonce týdnech). Navíc díky ní získáme z jediného vzorku krve kompletní mutační spektrum nádorových klonů v těle pacienta, protože se do krevního řečiště uvolňuje ctDNA ze všech nádorových ložisek (Bettegowda et al., 2014). Kromě získání základního mutačního profilu primárního nebo sekundárního nádoru lze díky tekuté biopsii detekovat nově vzniklé mutace způsobující sekundární rezistenci nádoru v průběhu léčby a umožnit tak její včasné pozměnění (Bratman, Newman, Alizadeh, & Diehn, 2015).



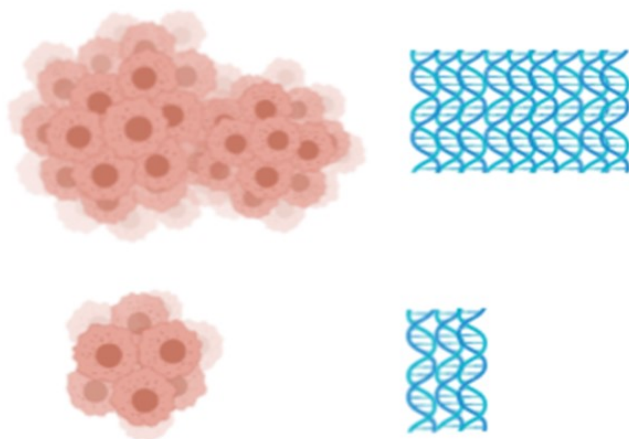
Obrázek 5: Záchyt všech nádorových klonů a mutací díky tekuté biopsii. Upraveno dle: Caldas, 2012.

1.5.2 Sledování dynamiky nádorového onemocnění

Hladiny ctDNA odráží aktuální množství tumorové masy v těle pacienta (tzv. tumor burden), díky čemuž můžeme průběžně monitorovat nárůst, či úbytek nádorové tkáně. Toho se využívá zejména pro dlouhodobé pooperační sledování pacientů (follow-up), se kterým je spojené i zhodnocení radikality operace, včasný záchyt progresu či rekurence onemocnění a dále také sledování odpovědi pacienta na probíhající léčbu (Levy et al., 2012).

TUMOR BURDEN

HLADINY ctDNA



Obrázek 6: Vztah tumor burden a hladin ctDNA. Hladiny ctDNA a množství tumorové masy (tumor burden) přímo korelují tak, že se zvyšujícím se tumor burden se zvyšuje hladina ctDNA v plazmě. Po léčebném zákroku se naopak tumor burden a s tím i hladiny ctDNA snižují. Upraveno dle: Yi et al., 2017. Vytvořeno v BioRender.com.

1.5.2.1 Dlouhodobé pooperační sledování pacientů (follow-up)

Pooperační sledování pacientů s mCRC umožňuje včasnou detekci progresu či rekurence onemocnění a následně okamžitou akci, ať už v podobě chirurgického zákroku nebo úpravy či změny chemoterapeutické léčby, což má zásadní vliv na prognózu pacienta. V současné době se k tomu standardně využívají zobrazovací techniky jako magnetická rezonance (MRI), rentgenové snímky, výpočetní tomografie (CT), ultrazvuk (UZ) a pozitronová emisní tomografie spojená s výpočetní tomografií (PET/CT), většinou ve spojení s vyhodnocením hladin tumorových markerů, a to karcinoembryonálního antigenu (CEA) a tumorového antigenu 19–9 (CA 19–9), (Schmoll & Stein, 2014). Tyto metody však mají svá úskalí. Především jsou to nedostačující senzitivita a specifita, finanční, personální a přístrojová náročnost a velká zátěž pro pacienta při použití kontrastních látek a rentgenového záření (Sun, 2008; Vukobrat-Bijedic et al., 2013). Proto se hledají molekulárně-onkologické markery, které by tato úskalí eliminovaly a jedním z velmi slibných je právě ctDNA, která má vysokou specifitu a při vhodné detekční metodě i vysokou senzitivitu (Vlassov, Laktionov, & Rykova, 2010). Jelikož je poločas rozpadu ctDNA v krvi menší než 2 hodiny, podává informaci o aktuálním stavu onemocnění a můžeme díky ní odhalit rekurenci, nebo progresi onemocnění dříve, než při klasickém vyšetření zobrazovacími metodami nebo tumorovými markery (Flamini et al., 2006). Ve studii Benešová et al. (2019) hodnotili

pooperační rekurenci na základě pozitivních výsledků z analýzy ctDNA, ze zobrazovacích metod a z tumorových markerů. Ze skupiny dlouhodobě sledovaných (6 a více měsíců) 32 pacientů, kteří podstoupili kurativní R0 resekci jaterních metastáz, mělo rekurenci 22 z nich (69 %). Ve 13 z 22 případů (59 %) byla rekurence souběžně detekována jak ctDNA, tak zobrazovacími metodami a tumorovými markery. U 7 z 22 případů (32 %) byly však tumorové markery negativní a u 6 z 22 případů (27 %) nedetekovaly přítomnost tumoru zobrazovací metody. ctDNA byla pozitivní u všech pacientů s rekurencí (22/22, 100 %), a navíc u čtyř pacientů analýza ctDNA odhalila rekurenci, zatímco výsledky ze zobrazovacích metod a tumorových markerů byly negativní. V rámci této studie tedy byla ctDNA nejcitlivějším nástrojem pro detekci rekurence onemocnění v porovnání se zobrazovacími metodami a tumorovými markery.

Faktu, že hladina ctDNA klesá po léčebném zákroku (chirurgickém odstranění, radiofrekvenční ablacii, chemoterapii), a naopak se rapidně zvýší při progresi, nebo rekurenci onemocnění, se využívá také při potvrzení radikality operace. Po R0 resekci by v plazmě neměla být přítomna žádná ctDNA a pokud je, tak to signalizuje, že v těle pacienta zůstal zbytek nádorové tkáně a jedná se ve skutečnosti o resekci R1, nebo R2. To také ve výše zmiňované studii potvrdili, kdy ze 28 případů pacientů s R0 radikální resekce bylo ctDNA negativních 26 (93 %) a u zbylých dvou pacientů s pozitivní ctDNA došlo k časné rekurenci po 6 měsících. V případě radikality resekce R1, kdy jsou přítomné mikroskopické zbytky nádorové tkáně, byly ctDNA pozitivní 4 pacienti ze 7 (57 %) a nejprůkazněji vyšly výsledky u radikality resekce R2 s makroskopickým zbytkem tumoru v těle pacienta, kdy ctDNA pozitivní byly všichni pacienti (15/15, 100 %). Tyto výsledky ukazují, že je ctDNA u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem perspektivním nástrojem pro včasnou detekci rekurence onemocnění i pro potvrzení radikality operace (Benešová et al., 2019).

1.5.2.2 Sledování odpovědi na léčbu a odhad prognózy

Odpověď na chemoterapeutickou léčbu se hodnotí na základě změn v množství nádorové hmoty v těle pacienta a zatím se primárně stanovuje na základě radiologického vyšetření, které je ale časově i finančně nákladné, a navíc zatěžuje pacienta ionizujícím zářením (Sun, 2008; Eisenhauer et al., 2009). Proto se jako teoreticky možná metoda zkoumá analýza ctDNA a její využití jakožto pomocného markeru účinnosti chemoterapeutické léčby na

základě změn v jejích hladinách v průběhu léčby. Vyšší míra odpovědi na chemoterapii a delší přežití bez progresu (PFS) jsou popsány u pacientů, u kterých byl zaznamenán pokles v hladinách ctDNA v průběhu léčby ve srovnání s těmi, u kterých byla hladina ctDNA stabilní, nebo stoupala (Tie et al., 2015). Takové výsledky zaznamenali i ve studii Garlan et al. (2017), ve které zkoumali, zdali mohou být časné změny v koncentraci ctDNA markerem účinnosti léčby. Do této studie byli zařazeni pacienti s mCRC podstupující první nebo druhou linii chemoterapie, kterým odebrali plazmu před prvním, druhým a třetím cyklem chemoterapie a provedli na ní analýzu ctDNA, resp. mutací v genech *KRAS*, *BRAF* a *TP53*. Na základě změn v koncentraci ctDNA mezi odběrem před prvním cyklem chemoterapie a druhým nebo třetím cyklem, rozdělili pacienty do dvou skupin na tzv. dobré a špatné ctDNA respondenty. U pacientů ve skupině dobrých respondentů nádor zareagoval na léčbu, došlo k poklesu koncentrace ctDNA a vykazovali delší PFS. Naopak u pacientů ze skupiny špatných ctDNA respondentů k výraznému poklesu nedošlo. Tyto výsledky naznačují, že ctDNA dokáže být relevantní marker terapeutické účinnosti a stojí za další podrobnější zkoumání.

2 Cíle a hypotézy

Hlavní cíle diplomové práce byly:

1. optimalizovat izolaci volné ctDNA pro zvýšení jejího zachytu v plazmě pomocí výběru vhodného izolačního protokolu a odhalení možné příčiny inhibice PCR reakce za testování dvou hypotéz:
 - A. DNA, resp. látky, navázané na její strukturu, jsou inhibičním faktorem reakce
 - B. standardně používaná DNA polymeráza není dostatečně efektivní
2. otestovat ctDNA jako marker radikality operace
3. sledovat vybranou podskupinu pacientů, u kterých byly k dispozici vzorky nádorové tkáně a sériové náběry plazmy po dobu delší než 1 rok, pro včasný záchyt rekurence onemocnění

3 Materiál a metody

3.1 Soubor pacientů

V rámci vědeckého grantu jsou k dispozici vzorky a klinické údaje od pacientů s kolorektálním karcinomem ve stádiu I – IV, přičemž má diplomová práce tvořit jeho dílčí část zaměřující se pouze na pacienty s metastatickým kolorektálním karcinomem (stádium IV). Pro účely mé práce jsem vybrala podsoubor 21 pacientů, kterým byl diagnostikován metastatický kolorektální karcinom, podstoupili chirurgické odstranění nádorových ložisek s různou radikalitou resekce (R0, R1, R2) a měli k dispozici vzorek nádorové tkáně k mutační analýze. Všichni tito pacienti byli ze tří klinických pracovišť, a to z Ústřední vojenské nemocnice, Thomayerovy nemocnice a Fakultní nemocnice v Motole.

3.1.1 Dlouhodobé sledování (follow-up)

Pacienti s dlouhodobým follow-upem byli ti, u kterých byla předoperační plazma ctDNA pozitivní a byli sledováni na její přítomnost v plazmě více než 1 rok. Průběžně u nich byla korelována pozitivita či negativita ctDNA s aktuálním stavem známým z lékařských zpráv.

3.2 Vzorky

Na nemocničních pracovištích byly pacientům při operaci odebírány vzorky tkáně primárního tumoru nebo metastázy a následně nativně uchovávány při teplotě -20 °C. Dále zde také byla pacientům odebírána periferní krev do dvou zkumavek Vacutainer s K2 EDTA, tzv. nesrážlivá krev, a to těsně před operací, zpravidla do týdne (max. do 12 dní) po operaci a následně v 3-6měsíčních intervalech, v ojedinělých případech i po více než 6 měsících, v závislosti na dostupnosti pacienta v rámci follow-upu. Z periferní krve byla ihned po odběru centrifugací odseparována plazma pro analýzu ctDNA a uchovávána při teplotě -20 °C. Označení vzorků plazmy bylo zavedeno jako PI (odběr před operací), PIII (odběr po operaci), PIV a dále (odběry v rámci follow-upu pacienta). Všechny vzorky tkání a plazem byly průběžně sváženy do laboratoře Genomac, kde byly ihned analyzovány nebo uloženy do mrazícího boxu při teplotě -20 °C.

3.3 Metody

3.3.1 Izolace DNA ze vzorku nádorové tkáně

Použité přístroje:

- Laminární box II. třídy – biohazard (Merci, Česká republika)
- Mikrocentrifuga Gyrozen 1524 (Gyrozen, Korea)
- Digitální blokový termostát (VWR International, Anglie)
- Vortex mixer VV3 (VWR International, Anglie)
- Mikrocentrifuga Ministar Silverline 8x0 (VWR International, Anglie)

Použitá izolační souprava (kit):

- GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA), (Sigma-Aldrich, 2017)
 - Použité chemikálie:
 - Součástí kitu:
 - Lysis Solution T
 - Lysis Solution C
 - Column Preparation Solution
 - Wash Solution
 - Proteinase K
 - Dále:
 - Ethanol (96%) (Penta, Česká republika)
 - Eluční voda – PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika)

Princip kitu spočívá v zachycení genomové DNA na silikagelové membráně umístěné v kolonce, následném promývání a eluci DNA do eluční zkumavky. Celý izolační proces jsem prováděla ve sterilním biohazardním boxu a k manipulaci se vzorky a s roztoky jsem použila sterilní špičky s filtrem.

V prvním kroku jsem malý vzorek tkáně vložila do označené 2 ml zkumavky. Následně jsem k němu napipetovala 360 µl Lysis Solution T a 40 µl Proteinase K, směs jsem důkladně zvortexovala a nechala přes noc inkubovat v blokovém termostatu nastaveném na 55 °C. Následující den jsem přidala 360 µl Lysis Solution C, řádně zvortexovala a nechala

inkubovat při 77 °C 10 minut. Poté jsem k lyzátu přidala 360 µl ledového 96% ethanolu a směs důkladně promíchala. V mezičase jsem si připravila a označila kolonku a napipetovala na ní 500 µl Column Preparation Solution, který zajišťuje co nejefektivnější navázání DNA na silikagelovou membránu. Následně jsem kolonku vložila do centrifugy nastavené na 12 000 x g a centrifugovala 1 minutu. Posléze jsem na kolonku přenesla 680 µl lyzátu a centrifugovala při 6500 x g 1 minutu. Tento krok jsem opakovala ještě jednou, aby se přes kolonku přefiltroval celý obsah zkumavky o objemu 1 120 µl. Dále následovaly 2 promývací kroky, při kterých jsem nejprve na kolonku napipetovala 500 µl Wash Solution a centrifugovala při 6500 x g 1 minutu. Při druhém promývání jsem napipetovala stejný objem Wash Solution, ale centrifugovala při 16 000 x g 3 minuty a pokračovala další centrifugací při 16 000 x g 1 minutu, aby došlo k vysušení membrány. Nakonec jsem provedla eluční krok, kdy jsem kolonku přenesla do nové označené 1,5 ml eluční mikrozkušavky a napipetovala jsem na ní 200 µl sterilní eluční vody vyhřáté na 70 °C, nechala inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugovala 6500 x g 1 minutu. V případě, že jsem vyizolovanou DNA ihned nepoužila k dalším analýzám, skladovala jsem ji v mrazícím boxu při -20 °C.

3.3.2 Izolace a přečištění cfDNA z plazmy

Použité přístroje:

- Laminární box II. třídy – biohazard (Merci, Česká republika)
- Mikrocentrifuga Gyrozen 1524 (Gyrozen, Korea)
- Digitální blokový termostat (VWR International, Anglie)
- Vortex mixer VV3 (VWR International, Anglie)
- Mikrocentrifuga Ministar Silverline 8x0 (VWR International, Anglie)

Izolaci cfDNA z plazmy jsem prováděla vždy v biohazardním boxu a používala jsem sterilní špičky s filtrem. Před izolací jsem vzorky plazem nechala rozmrazit, jelikož byly skladovány v mrazícím boxu při -20 °C.

Použité izolační soupravy (kity):

- QIAamp® MinElute® Spin Kit (Qiagen, Německo), (Qiagen, 2020)
 - Použité chemikálie:
 - Součástí kitu:
 - Buffer AL
 - Buffer AW1
 - Buffer AW2
 - Protease K
 - Dále:
 - Ethanol (96%) (Penta, Česká republika)
 - Eluční voda – PCR Ultra H2O (Top-Bio, Česká republika)

Tento izolační kit funguje, stejně jako předchozí, na základě zachycení cfDNA na pevnou silikagelovou membránu umístěnou v kolonce, opakovaném promývání a eluci cfDNA.

Na začátku izolace jsem pečlivě označila mikrozkušavku o objemu 2 ml číslem vzorku. Poté jsem do ní postupně napipetovala 650 µl Buffer AL, 40 µl Protease K a 650 µl vzorku plazmy. Směs jsem řádně zvortexovala a dala inkubovat do blokového termostatu vyhřátého na 56 °C na 15 minut. Mezitím jsem si připravila a označila kolonku. Ihned po inkubaci jsem k lyzátu napipetovala 750 µl ledového 96% ethanolu a zvortexovala. V dalším kroku jsem napipetovala 680 µl směsi lyzátu a ethanolu na kolonku a centrifugovala při 6000 x g 1 minutu. Tento krok jsem dvakrát zopakovala, dokud nebyl přes kolonku přefiltrován celý obsah zkumavky o objemu 2 090 µl. Poté jsem na kolonku napipetovala 500 µl Buffer AW1 a dala centrifugovat při 6000 x g 1 minutu. Další krok byl totožný, tentokrát ale s použitím Buffer AW2. Posledním promývacím krokem bylo napipetování 500 µl 96% ethanolu na kolonku a centrifugace při 6000 x g 1 minutu. Posléze jsem provedla další centrifugaci, tentokrát při 21 000 x g 3 minuty. Následovalo vysoušení membrány, při kterém jsem kolonku přenesla do čisté sběrné zkumavky, pootevřela víčko a nechala v biohazardním boxu 1,5 hodiny. Posledním krokem poté byla eluce cfDNA. Kolonku jsem přenesla do označené eluční mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a na střed membrány jsem napipetovala 30 µl sterilní eluční vody vytemperované na laboratorní teplotu a nechala inkubovat 1 minutu. Po přidání eluční vody jsem kolonku centrifugovala při 21 000 x g 1 minutu a tím jsem získala eluci obsahující cfDNA. V případě, že jsem ihned poté prováděla další analýzy,

jsem dala vzorky do lednice (8 °C), pokud ne, tak jsem vzorky cfDNA uložila do mrazícího boxu (- 20 °C).

- Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit-mini (Norgen Biotek, Kanada), (Norgen Biotek, 2017)
 - Použité chemikálie:
 - Binding Buffer B
 - Proteinase K
 - Solution WN
 - Wash Solution A
 - Elution Buffer B

Tento kit funguje na principu postupné filtrace směsi plazmy a chemikálií přes dva typy kolonek. Kolonky jsou z patentované pryskyřicové separační matrix společnosti Norgen Biotek.

V prvním kroku jsem napipetovala 500 µl plazmy do označené mikrozkušavky o objemu 2 ml. Poté jsem k ní přidala 30 µl Proteinase K, pečlivě zvortexovala a dala inkubovat do blokového termostatu nahřátého na 60 °C na 10 minut. Po inkubaci jsem do zkumavky napipetovala 1 ml Binding Buffer B a opět řádně zvortexovala. Následně jsem přenesla 750 µl směsi na kolonku Mini Spin vložené do sběrné zkumavky a centrifugovala 2 minuty při 3 300 x g. Tento krok jsem opakovala ještě jednou, aby se přes kolonku přefiltrovala veškerá směs. Poté jsem na kolonku napipetovala 500 µl Solution WN a centrifugovala 1 minutu při 3 300 x g. Následně jsem udělala ten samý krok, jen s použitím 500 µl Wash Solution A a posléze ho ještě jednou zopakovala. V dalším kroku jsem prázdnou kolonku centrifugovala 2 minuty při 13 000 x g a poté ji přenesla do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Následně jsem na ní napipetovala 100 µl Elution Buffer B a nechala inkubovat při laboratorní teplotě 2 minuty. Po inkubaci jsem provedla dvě centrifugace, první při 400 x g 1 minutu následovanou centrifugací při 5 800 x g 2 minuty. Tím jsem získala 100 µl eluátu obsahujícího DNA, ke kterému jsem přidala 300 µl Binding Buffer B, zvortexovala a přenesla tuto směs na druhý typ kolonky, tzv. Micro Spin, vložené do sběrné zkumavky. Kolonku jsem centrifugovala 1 minutu při 3 300 x g. Posléze jsem na kolonku napipetovala 500 µl Wash Solution A a centrifugovala 1 minutu při 3 300 x g. Tento promývací krok jsem provedla ještě jednou. Následně jsem kolonku centrifugovala 2 minuty při 13 000 x g.

Po centrifugaci jsem kolonku přenesla do nové zkumavky o objemu 1,5 ml, do které jsem eluovala konečnou cfDNA za použití 30 µl Elution Buffer B a nechala inkubovat 2 minuty při laboratorní teplotě. Nakonec jsem kolonku centrifugovala nejprve 1 minutu při 400 x g a následně 2 minuty při 5 800 x g. Tím jsem získala eluci obsahující cfDNA.

- PME free-circulating DNA extraction kit (Analytik Jena, Německo), (Analytik Jena, 2016)

Tento kit obsahuje 2 systémy, které se liší některými použitými chemikáliemi. Každý systém navíc umožňuje izolaci cfDNA ze dvou vstupních objemů plazmy, a to z 500 µl a 2 ml. Schematický přehled možných variant izolačních protokolů viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Schematický přehled možných izolačních protokolů.

Systém	Vstupní objem plazmy (ml)	Označení izolačního protokolu
A	0,5	A1
A	2	A2
B	0,5	B1
B	2	B2

■ Použité chemikálie pro systém A:

Enrichment Reagent VCR-1
 Enrichment Reagent VCR-2
 ddH₂O
 Lysis Solution SE (protokol A1)
 Lysis Solution SEP (protokol A2)
 Proteinase K
 Binding Solution SBS
 Washing Solution GS
 Washing Solution BS
 RNase-free Water

■ Použité chemikálie pro systém B:

Enrichment Reagent VCR-1
 Enrichment Reagent VCR-2
 ddH₂O

Lysis Solution GS
Proteinase K
Binding Solution VL
Washing Solution GS
Washing Solution BS
RNase-free Water

Princip kitu PME free-circulating DNA extraction kit je založen na tzv. Polymer Mediated Enrichment (PME), čímž se odlišuje od předchozích dvou. V prvním kroku se volná cirkulující DNA zachytí na speciální polymer, a tím dojde k jejímu nabohacení. Následuje standardní lyzační krok, který se kromě použitých lyzačních roztoků shoduje u všech čtyřech protokolů. Poslední fází je klasická eluce cfDNA.

Dále jsem pro zjednodušení popsala postup protokolu A1. Ostatní tři protokoly jsou shodné, pouze se liší v některých použitých typech a objemech chemikálií, případně v délce inkubace a podmínkách centrifugace.

V prvním kroku jsem do označené mikrozkušavky o objemu 1,5 ml napipetovala 500 µl plazmy a 30 µl Enrichment Reagent VCR-1 a krátce zvortexovala. Poté jsem přidala 150 µl Enrichment Reagent VCR-2, zvortexovala a nechala inkubovat při laboratorní teplotě 1 minutu. Po inkubaci jsem zkumavku centrifugovala 21 200 x g 3 minuty. Následně jsem velmi opatrně odpipetovala supernatant, aby se nepoškodila vzniklá peleta. V dalším kroku jsem k peletě přidala 1 ml ddH₂O, třikrát otočila zkumavku tam a zpět a centrifugovala maximální rychlostí 3 minuty. Poté jsem opět opatrně odpipetovala supernatant. K peletě jsem napipetovala 400 µl Lysis Solution SE a rozpustila ji opakovaným nasáváním. Následně jsem přidala 50 µl Proteinase K, řádně zvortexovala a dala inkubovat na 15 minut při teplotě 70 °C. Po dobu inkubace jsem zkumavku 3x zvortexovala a nakonec krátce centrifugovala. K lyzátu jsem dále přidala 400 µl Binding Solution SBS a pečlivě promíchala nasáváním tam a zpět. Poté jsem postupně celou směs přenesla na kolonku (Spin Filter) vloženou do sběrné zkumavky a centrifugovala při 11 000 x g 1 minutu. Po centrifugaci jsem na kolonku napipetovala 500 µl Washing Solution GS, centrifugovala při 11 000 x g 1 minutu. Následně jsem tento krok provedla s 650 µl Washing Solution GS a poté s 650 µl Washing Solution BS. Posléze jsem kolonku přenesla do nové sběrné zkumavky a centrifugovala 21 200 x g 3 minuty, abych se zbavila veškerého ethanolu z Washing Solutions. Nakonec jsem přenesla kolonku do eluční mikrozkušavky o objemu 1,5 ml,

napipetovala na ní 30 µl RNase-free vody nahřáté na 70 °C a nechala inkubovat při laboratorní teplotě 2 minuty. V posledním kroku jsem kolonku centrifugovala při 11 000 x g 1 minutu, čímž jsem získala eluci obsahující cfDNA.

3.3.2.1 Přečištění cfDNA

Přečištění cfDNA jsem prováděla za použití izolačního kitu QIAamp® MinElute® Spin Kit. Vstupním materiálem byla již vyizolovaná cfDNA, která se zpracovávala stejně jako plazma při izolaci cfDNA s těmito odlišnostmi: objem vstupního materiálu – 30 µl namísto 650 µl, objem pufru AL - 200 µl namísto 650 µl, objem ledového ethanolu - 250 µl namísto 750 µl a absence proteinázy K. Použité přístroje a chemikálie se shodovaly s těmi při klasické izolaci cfDNA z plazmy.

3.3.3 PCR s následnou tvorbou heteroduplexů

Použité přístroje:

- Streamline® Polymerase Chain Reaction Cabinet (Esco Micro, Singapur)
- Vortex mixer VV3 (VWR International, USA)
- Vortex Reax Top (Heidolph Instruments, Německo)
- Mikrocentrifuga Ministar Silverline (VWR International, USA)
- Mikrocentrifuga Minispin (Eppendorf, Česká republika)
- Minicentrifuga MiniStar (Tomos Life Science Group, Šanghaj)
- Minicentrifuga Ministar Silverline (VWR International, USA)
- Termocyklér PTC-100 PCR Programmable Thermal Controller 96-Well (MJ Research, USA)
- Termocyklér T1 Thermoblock (Biometra, Německo)
- Termocyklér T-Personal Combi (Biometra, Německo)
- Termocyklér C1000 Touch (Bio-Rad, USA)

Po izolaci genomové DNA z nádorové tkáně, či cfDNA z plazmy jsem provedla PCR reakci. PCR je zkratka pro polymerázovou řetězovou reakci, při které cyklicky dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA, navázání páru primerů (annealingu) a následné polymeraci, což vede k amplifikaci (namnožení) vybraného úseku DNA. Teplota annealingu se mění dle

analyzovaných markerů a podle ní jsou pro jednotlivé markery nastavené PCR programy. Podmínky PCR programů v termocykléru jsem uvedla v Tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky PCR programu v rámci amplifikační reakce.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	5 min	1
2	94 °C	30 s	34
3	viz annealing teplota v Tabulce 3	30 s	
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	10 min	
6	15 °C	∞	1

V PCR místnosti jsem si nejprve připravila potřebné množství mikrozkušavek o objemu 0,2 ml a z mrazícího boxu vyjmula všechny chemikálie, které tvoří PCR reakční mix a krátce je zvortexovala. Jednotlivé komponenty PCR reakční směsi jsou fluorescenčně značené primery (pravý a levý), (Sigma Aldrich, Německo), PCR Ultra Pure H₂O (Top-Bio, Česká republika), PPP Master Mix, jehož součástí je Taq polymeráza, MgCl₂, Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄, Tween 20, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, barvivo, stabilizátory a aditiva (Top-Bio, Česká republika). Objemy jednotlivých komponent jsem si předem vypočítala na konkrétní počet vzorků. Připravený mix jsem krátce zvortexovala a centrifugovala a následně rozpipetovala do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml špičkami s filtrem po 9 µl, pokud se jednalo o PCR reakci, kde byla templátová DNA z nádorové tkáně, nebo po 14 µl v případě cfDNA z plazmy. K této směsi jsem poté napipetovala ve sterilním PCR boxu stanovené množství templátové DNA, což je u nádorové DNA 1 µl a u cirkulující volné DNA 6 µl. Celkový objem PCR reakčního mixu tedy činil 10 µl u nádorové DNA a 20 µl u cfDNA z plazmy. Tento mix jsem krátce zvortexovala a centrifugovala. Poté jsem zkontrolovala, jestli nejsou v mikrozkušavce přítomné vzduchové bubliny, případně znovu zcentrifugovala a vložila všechny vzorky do termocykléru, kde jsem nastavila konkrétní PCR program pro daný marker. Kromě analyzovaných vzorků jsem ještě současně provedla PCR reakce dvou kontrolních vzorků. Jako první kontrolní vzorek sloužila DNA s potvrzenou negativitou na sledovanou mutaci (pozitivní kontrola wild-type). Druhým kontrolním vzorkem byla tzv. negativní kontrola, což je PCR reakce, do které se místo templátové DNA přidává voda.

3.3.3.1 PCR reakce nádorové DNA a cfDNA

U každého vzorku nádorové tkáně jsem prováděla PCR amplifikaci vybraných úseků 8 markerů. Jak jsem již zmínila v úvodu, jedná se vybrané úseky protoonkogenů a tumor supresorových genů, ve kterých se u kolorektálního karcinomu nejčastěji vyskytují somatické mutace. Seznam markerů a jejich příslušná annealing teplota viz Tabulka 3.

Tabulka 3: Seznam markerů, jejich vyšetřovaných oblastí a délek PCR produktů s příslušnými annealing teplotami.

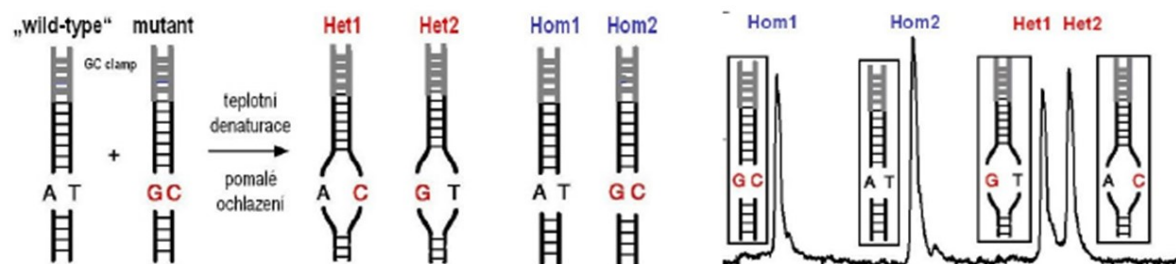
Gen (marker)	Exon	Analyzované kodóny	Délka PCR produktu (bp)	Annealing teplota (°C)
<i>KRAS</i>	2	12,13	112	54
<i>TP53</i>	5	170-187	107	66
	6	187-224	169	61
	7	225-261	160	61
	8	262-307	151	61
<i>APC</i>	15	1290-1335	136	62
<i>PIK3CA</i>	9	542	106	63
<i>BRAF</i>	15	600	230	59

3.3.3.2 Tvorba heteroduplexů

Ihned po skončení PCR amplifikace jsem na termocykléru nastavila teplotní program pro tvorbu heteroduplexů viz Tabulka 4. Při tomto programu dochází k denaturaci molekul dvouřetězcové DNA vysokou teplotou a následně k pomalému ochlazování, což má za následek jejich reasociaci. V případě, že není ve vzorku přítomna mutace, vzniká molekula původní dvouřetězcové DNA, tzv. homoduplex. Pokud mutace přítomna je, dochází ke kombinaci mutovaného a nemutovaného řetězce, čímž vzniká v molekule DNA oblast nekomplementarity, tzv. heteroduplex. Výsledná směs je následně analyzována a separována pomocí denaturační kapilární elektroforézy.

Tabulka 4: Teplotní program pro tvorbu heteroduplexů.

Krok	Teplota	Čas	Pozn.	Počet cyklů
1	95 °C	8 min	pokles teploty o 0,10 °C za sekundu	1
2	65 °C	30 min		
3	15 °C	∞		



Obrázek 7: Znárodnění tvorby a separace heteroduplexů. Převzato z: Benešová, 2007.

Het1, Het2 – heteroduplexy, Hom1, Hom2 – homoduplexy

3.3.4 Denaturační kapilární elektroforéza

Použité přístroje:

- DNA analyzátor ABI PRISM 3100, 16 kapilár (Applied Biosystems, USA)
- Vortex Reax Top (Heidolph Instruments, Německo)
- Minicentrifuga Ministar Silverline (VWR International, USA)
- Centrifuga Universal 32 (Hettich, Německo)

Použité chemikálie:

- Demineralizovaná voda (Watrex, Česká republika)
- CE Running Pufr (Carolina Biosystems, Česká republika)
- POP-7TM polymer (Carolina Biosystems, Česká republika)

Denaturační kapilární elektroforéza (DCE) slouží k detekci somatických mutací ve vzorcích (PCR produktech) vzniklých po aplikaci programu tvorby heteroduplexů. Princip spočívá v separaci homoduplexů a heteroduplexů na základě jejich rozdílných denaturačních teplot a vlastností. Při vhodné teplotě nejprve nastává postupné rozevírání dvouřetězcových molekul DNA obsahujících heteroduplex, což způsobuje jejich zpomalení v průběhu elektroforézy. Denaturace a následné zpomalování homoduplexních dvouřetězcových molekul díky jejich plné komplementaritě probíhá v menší míře, a tak dochází k jejich separaci.

Podmínky DCE analýzy jsou specifické pro analyzovaný marker a souvisí s jeho sekvencí a denaturačními vlastnostmi, viz Tabulka 5. Jak se následně vyhodnocují a interpretují výsledky analýzy metodou DCE jsem popsala v další kapitole 3.5.5.1.

Tabulka 5: Podmínky DCE analýzy pro jednotlivé markery.

Gen (marker)	Podmínky DCE		
	teplota (°C)	dávkování – PCR produkty z tkáňové DNA	dávkování – PCR produkty z cfDNA
<i>KRAS</i>	50	2kV 10s	5kV 50s
<i>TP53</i>	58	3kV 20s	5kV 50s
	52	3kV 20s	5kV 50s
	52	3kV 20s	5kV 50s
	56	3kV 20s	5kV 50s
<i>APC</i>	52	2kV 10s	5kV 50s
<i>PIK3CA</i>	48	2kV 10s	5kV 50s
<i>BRAF</i>	48	2kV 10s	5kV 50s

Příprava 96 jamkové destičky, kterou jsem vkládala do DNA analyzátoru, spočívala nejprve v naředění PCR produktů, pozitivní kontroly wild-type a negativní kontroly v ředící destičce a následném napipetování těchto vzorků do 96 jamkové destičky, do které jsem předem napipetovala vodu o příslušném objemu pro požadované finální ředění viz Tabulka 6. Všechny vzorky jsem před použitím krátce zvortexovala a centrifugovala.

Tabulka 6: Ředění jednotlivých typů vzorků do DNA analyzátoru pro DCE analýzu.

Typ vzorku	Ředění					
	ředící destička			96 jamková destička do DCE		
	objem vzorku	objem vody	ředění	objem vzorku z ředící destičky	objem vody	finální ředění
PKwt	1 µl	99 µl	100x	1 µl	9 µl	1000x
	1 µl	49 µl	50x	1 µl	99 µl	5000x
PCR produkt z tkáňové DNA	1 µl	99 µl	100x	1 µl	9 µl	1000x
	1 µl	49 µl	50x	1 µl	99 µl	5000x
PCR produkt z cfDNA	1 µl	9 µl	10x	1 µl	9 µl	100x
	1 µl	49 µl	50x	1 µl	9 µl	500x
NK	1 µl	9 µl	10x	1 µl	9 µl	100x
	1 µl	49 µl	50x	1 µl	9 µl	500x

Poté, co jsem měla všechny vzorky správně naředěné v 96 jamkové destičce, jsem ji zvortexovala a vložila do DNA analyzátoru. Ten jsem nastavila v závislosti na vyšetřovaném markeru viz Tabulka 5.

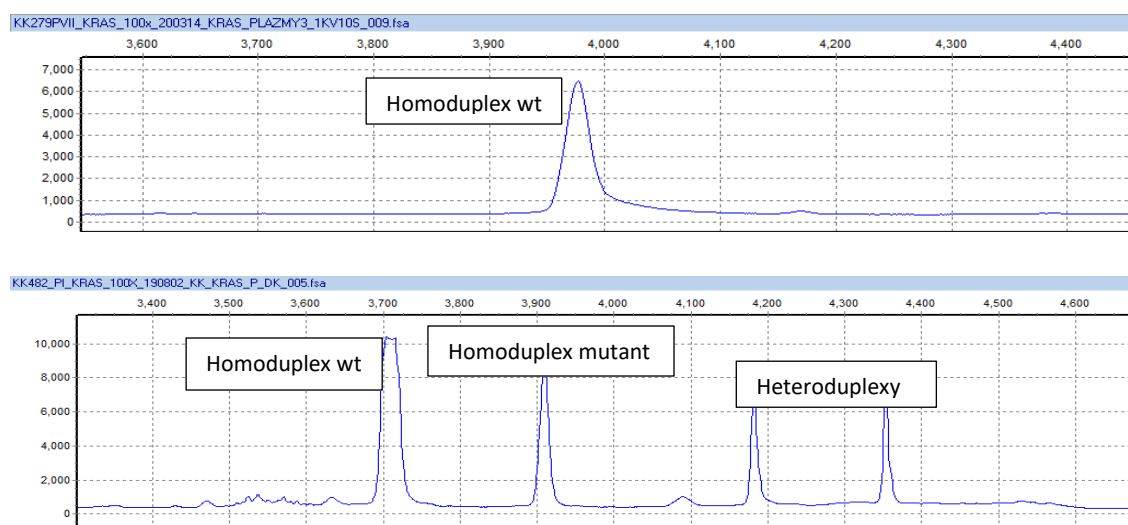
3.3.5 Vyhodnocení výsledků

3.3.5.1 Vyhodnocení elektroferogramů

- Počítačový program:

GeneMarker[®], verze 4.2.2 (SoftGenetics, USA)

Vyhodnocení výsledků z denaturační kapilární elektroforézy jsem provedla pomocí počítačového programu GeneMarker[®], ve kterém jsem si vždy otevřela příslušný soubor s požadovanými vzorky. Výstupem byl tzv. elektroferogram, podle kterého jsem vyhodnotila, zdali je vzorek na mutaci v daném markeru pozitivní, či negativní. V případě, že byl na elektroferogramu přítomný pouze jeden pík, znamenalo to, že byl detekován jeden typ molekuly DNA, tzv. homoduplex wild-type, a vzorek byl negativní, tzn. v amplifikovaném úseku daného genu nebyla přítomná mutace (Obrázek 8a). Pokud byly na elektroferogramu přítomné čtyři píky, znamenalo to, že byly detekovány čtyři různé molekuly DNA, a to tzv. homoduplex wild-type, homoduplex mutant a 2 heteroduplexy, tím pádem jsem vzorek vyhodnotila jako pozitivní, tzn. byla přítomná mutace v daném úseku vyšetřovaného genu (Obrázek 8b).



Obrázek 8: Ukázky elektroferogramů. Autor.

Obrázek 8a – negativní vzorek (wild-type), Obrázek 8b – pozitivní vzorek, mutace v genu KRAS

3.3.5.2 Výpočet procentuálního zastoupení mutované frakce

U optimalizačních experimentů jsem potřebovala zjistit, jaké procento z celkové vyizolované cfDNA tvoří ctDNA. Frakci mutovaných alel (MAF) jsem vypočítala ze vzorce založeném na odečtu výšek jednotlivých píků získaných denaturační kapilární elektroforézou viz Rovnice 1.

Rovnice 1: Výpočet procentuálního zastoupení frakce mutovaných alel (MAF).

$$\frac{HOMmut + \frac{HET1+HET2}{2}}{HOMwt + HOMmut + HET1 + HET2} \times 100$$

HOMmut označuje výšku píku mutovaného homoduplexu odečtenou z elektroferogramu. HOMwt označuje výšku u nemutovaného homoduplexu (homoduplex wild-type) a HET1, HET2 jsou výšky heteroduplexů. Celou rovnici jsem vynásobila stem, abych získala procentuální vyjádření.

Při stanovení MAF bylo na základě výsledků u některých vzorků nutné optimalizovat ředění vzorku a podmínky DCE analýzy, aby byl výpočet u konkrétního vzorku co nejpřesnější.

4 Výsledky

4.1 Optimalizace izolace a zachytu ctDNA

4.1.1 Porovnání izolačních kitů

V první části optimalizace jsem porovnávala 6 izolačních protokolů za použití 3 různých komerčních kitů, které se kromě postupů, chemikálií a kolonek lišily i ve vstupním objemu plazmy, viz Tabulka 7. Hodnocenými faktory byly výtěžek cfDNA a zachyt ctDNA, přičemž cílem bylo vybrat protokol vykazující nejvyšší zastoupení ctDNA v celkové cfDNA. Testovala jsem 2 vzorky lišící se jak v mutovaných genech, tak v zastoupení mutované frakce. První vzorek (KK470 PIV) měl mutované 2 markery, *KRAS* a *TP53-8*, s frakcemi mutovaných alel 38 % pro *KRAS* a 28 % pro *TP53-8*. Druhý vzorek (KK473 PI) byl mutovaný v markeru *KRAS* a měl zastoupení mutované frakce 3,4 %.

Tabulka 7: Použité izolační protokoly a jejich vstupní objemy plazmy.

Označení izolačního protokolu	Vstupní objem plazmy [ml]
Q	0,5
N	0,5
A1	0,5
A2	2
B1	0,5
B2	2

Q = komerční kit *QIAamp® MinElute® Spin Kit* (Qiagen, Německo), *N* = komerční kit *Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit-mini* (Norgen Biotek, Kanada), *A1*, *A2* = komerční kit *PME free-circulating DNA extraction kit* (Analytik Jena, Německo), systém *A*, *B1*, *B2* = komerční kit *PME free-circulating DNA extraction kit* (Analytik Jena, Německo), systém *B*

Koncentraci vyizolované cfDNA, kterou kolegyně změřila na spektrofotometru, jsem přepočítala na výtěžek nanogramů cfDNA v 1 ml plazmy. Nejvyšší hodnoty výtěžku cfDNA dosáhl u vzorku KK470 PIV izolační protokol Q a u vzorku KK473 PI izolační protokol N. Naopak nejnižší hodnoty dosáhl u obou vzorků shodně izolační protokol B2. Co se týká výtěžku ctDNA, resp. zastoupení mutované frakce, byly výsledky nejednoznačné. U vzorku KK470 PIV a markeru *KRAS* jsem provedla 4 analýzy za různých ředění a podmínek dávkování, viz Tabulka 8. Výsledné procentuální zastoupení mutované frakce uvedené v Tabulce 10 je průměrem těchto čtyř hodnot. Nejvyšší výtěžek ctDNA měl izolační protokol N, naopak nejnižší výtěžek měl protokol A1.

Tabulka 8: Podmínky analýz u vzorku KK470 PIV a markeru KRAS.

Vzorek	Marker	Izolační protokol	Ředění	Dávkování
KK470 PIV	KRAS	Q	500x	2 kV/10s
			100x	3kV/30S
			500x	3kV/30S
			1000x	3kV/30S
		N	100x	2kV/10s
			100x	3kV/30S
			500x	3kV/30S
			1000x	3kV/30S
		A1	100x	2kV/10s
			100x	3kV/30S
			500x	3kV/30S
			1000x	3kV/30S
		A2	100x	2kV/10s
			100x	3kV/30S
			500x	3kV/30S
			1000x	3kV/30S

U druhého mutovaného markeru (*TP53-8*) tohoto vzorku jsem průměr zastoupení mutované frakce vypočítala na základě 3 analýz lišících se v ředění vzorku shrnutých v Tabulce 9.

Tabulka 9: Podmínky analýz u vzorku KK470 PIV a markeru TP53-8.

Vzorek	Marker	Izolační protokol	Ředění	Dávkování
KK470 PIV	TP53-8	Q	100x	5kV/50s
			100x	
			1000x	
		N	1000x	
			1000x	
			1000x	
		A1	500x	
			500x	
			1000x	
		A2	1000x	
			1000x	
			5000x	

Shodně jako u markeru *KRAS* jsem zaznamenala nejnižší výtěžek ctDNA u protokolu A1, avšak nejvyšší výtěžek ctDNA byl u izolačního protokolu A2. U vzorku KK473 PI jsem provedla jednu analýzu, a jelikož byl podíl mutované frakce u všech protokolů menší než 3,5 %, nebylo možné při takto nízkém detekčním signálu přesné zastoupení vypočítat. Při použití izolačních protokolů B1 a B2 byly oba vzorky ctDNA negativní.

Hodnoty výtěžků u obou vzorků za použití všech izolačních protokolů shrnuje Tabulka 10.

Tabulka 10: Hodnoty výtěžků cfDNA a ctDNA jednotlivých izolačních protokolů.

Vzorek	Výtěžek cfDNA [ng /ml]		Výtěžek ctDNA (MAF) [%]				
	KK470PIV	KK473PI	KK470PIV				KK473PI
Izolační protokol			KRAS	SD	TP53-8	SD	KRAS
Q	1120	268	40,7	1,6	27,7	0,4	< 3,5
N	520	530	43,2	1	25,4	1,3	< 3,5
A1	270	300	38,3	1,5	23,1	2,5	< 3,5
A2	137,5	80	38,7	1,6	29,2	1,1	< 3,5
B1	80	190	0	0	0	0	0
B2	35	75	0	0	0	0	0

zelená barva – nejvyšší hodnoty, červená barva – nejnižší hodnoty, modrá barva – ctDNA negativní, SD – směrodatná odchylka

4.1.2 Optimalizace PCR reakce

Kromě obecného problému s nízkým zachytem ctDNA je druhým problémem analýzy ctDNA častá neúspěšná PCR reakce, což vede k nemožnosti takové vzorky vyhodnotit, a jsou proto označeny jako „inconclusion“. Druhou část optimalizace jsem tedy věnovala návrhu experimentů, skrze které jsem chtěla zjistit, co by mohlo být inhibičním faktorem PCR reakce, a jaké změny v izolačním postupu by mohly tento problém vyřešit. V souvislosti s tím vyvstaly dvě domněnky o příčině neúspěšné analýzy při standardním postupu. První hypotéza byla, že samotná DNA, resp. látky, které jsou navázané na její strukturu, zabraňují nasednutí DNA polymerázy či jiných faktorů a inhibují PCR reakci. Druhá hypotéza byla, že použitá DNA polymeráza není dostatečně účinná. K testování jsem použila 3 již dříve analyzované vzorky plazmy, u kterých byla PCR reakce při standardním postupu a při použití 6 µl DNA do PCR reakce neúspěšná a předpokládala jsem u nich pozitivitu ctDNA. Při návrhu experimentů, které by objasnily možnou inhibici PCR reakce látkami navázanými na DNA, jsem zvolila tyto varianty:

1. přečištění DNA (viz kapitola 3.3.2.1)
2. jedenkrát opakování každého promývacího kroku
3. jedenkrát opakování celé sekvence tří promývacích kroků
4. snížení objemu DNA do PCR reakce na 2 µl

Výsledky těchto experimentů shrnuje Tabulka 11.

Tabulka 11: Výsledky experimentů v rámci testu inhibice PCR za hypotézy látek navázaných na DNA jako inhibičního faktoru.

Vzorek	Standardní postup	1. varianta: přečištění	2. varianta: 1x opakování promývacích kroků	3. varianta: 1x opakování celé sekvence promývání	4. varianta: 2 µl DNA do PCR
POZITIVITA ctDNA					
KK253 PI	inc.	poz. (MAF < 3 %)	inc.	inc.	inc.
KK242 PVI	inc.	poz. (MAF 4 %, SD 0,6)	inc.	inc.	poz. (MAF < 3 %)
KK404 PI	inc.	poz. (MAF 8 %, SD 0,3)	inc.	poz. (MAF 10 %, SD 0,6)	poz. (MAF 5 %, SD 0,1)

inc. = inconclusion, **poz.** = pozitivní

Pro ověření hypotézy, zdali není problém způsoben nízkou účinností DNA polymerázy, jsem testovala 2 různé polymerázy, a to hot-start termostabilní DNA polymerázu od firmy Promega a Taq DNA polymerázu od firmy Qiagen. Z důvodu ušetření finančních nákladů jsem porovnání provedla pouze na dvou vzorcích a zredukovala jsem objem PCR reakce na 10 µl (3 µl DNA do 7 µl premixu), aby byla spotřeba obou polymeráz co nejnižší. Analýzy obou vzorků při použití testovaných DNA polymeráz byly úspěšné, nicméně ve všech případech byly ctDNA negativní.

4.2 Analýza klinických vzorků

4.2.1 Mutační analýza tkáňových vzorků

U všech 21 pacientů jsem provedla analýzu panelu mutací ve vzorcích nádorové tkáně. Osmnáct z nich mělo v tkáni přítomnou alespoň jednu mutaci, a celkový zachyt byl tedy 86 % (18/21). Seznam těchto pacientů je uveden v Tabulce 12. Souhrnný počet zachycených mutací byl 27, přičemž u deseti pacientů byla v tkáni detekována jen jedna mutace, u sedmi pacientů dvě a u jednoho dokonce tři. Nejpočetnější byly mutace v genu *TP53* detekované 13 x a tvořily tak 48 % (13/27) z celkového počtu. Na druhém místě byly mutace v genu *KRAS* zachycené 7 x, a tvořily tak 26 % (7/27). Na třetím místě byl gen *APC*, který byl v mém souboru pacientů mutovaný jen 5 x, což je 19 % (5/27). Geny *BRAF* a *PIK3CA* byly shodně mutovány jen jednou a oba tak tvořily 4 % z celkového počtu mutací (1/27).

Tabulka 12: Seznam pacientů s detekovanými mutacemi v tkáňovém vzorku a příslušné mutované markery.

Číslo vzorku	Lokalizace mutace		
KK92	<i>TP53 (exon 5)</i>	<i>APC (exon 15)</i>	
KK139	<i>KRAS (exon 2)</i>		
KK140	<i>TP53 (exon 6)</i>		
KK145	<i>TP53 (exon 8)</i>		
KK172	<i>TP53 (exon 8)</i>		
KK180	<i>TP53 (exon 8)</i>	<i>PIK3CA (exon 9)</i>	
KK189	<i>TP53 (exon 6)</i>	<i>APC (exon 15)</i>	
KK367	<i>TP53 (exon 5)</i>		
KK379	<i>KRAS (exon 2)</i>		
KK463	<i>TP53 (exon 8)</i>	<i>APC (exon 15)</i>	
KK482	<i>KRAS (exon 2)</i>	<i>TP53 (exon 5)</i>	<i>BRAF (exon 15)</i>
KK566	<i>KRAS (exon 2)</i>	<i>TP53 (exon 6)</i>	
KK567	<i>KRAS (exon 2)</i>		
KK578	<i>TP53 (exon 5)</i>	<i>TP53 (exon 6)</i>	
KK596	<i>KRAS (exon 2)</i>		
KK599	<i>APC (exon 15)</i>		
KK614	<i>KRAS (exon 2)</i>		
KK696	<i>TP53 (exon 6)</i>	<i>APC (exon 15)</i>	

4.2.2 Záchyt ctDNA

Skupina 18 pacientů s mutacemi v tkáňovém vzorku byla následně vhodná ke sledování těchto mutací ve vzorku plazmy odebrané těsně před operací (PI). U jednoho z nich nebyl náběr plazmy PI k dispozici, a tak jsem celkový záchyt ctDNA provedla ze skupiny 17 pacientů. Z nich bylo 11 ctDNA pozitivních (měli detekovanou mutaci v DNA) a záchyt ctDNA byl tedy 65 % (11/17).

4.2.3 Radikalita operace vs. ctDNA

Korelaci mezi radikalitou operace a záchytem ctDNA po operaci jsem provedla na souboru pacientů, kteří měli náběr plazmy PI ctDNA pozitivní a měli k dispozici náběr plazmy PIII. Z těchto pacientů ani u jednoho nebyla provedena kurativní resekce R0, viz kapitola 1.2.2.1. Naopak největší skupinu (6) tvořili pacienti s radikalitou operace R1, viz kapitola 1.2.2.1, a z nich byli pozitivní na přítomnost ctDNA v PIII plazmě 2, což odpovídá záchytu

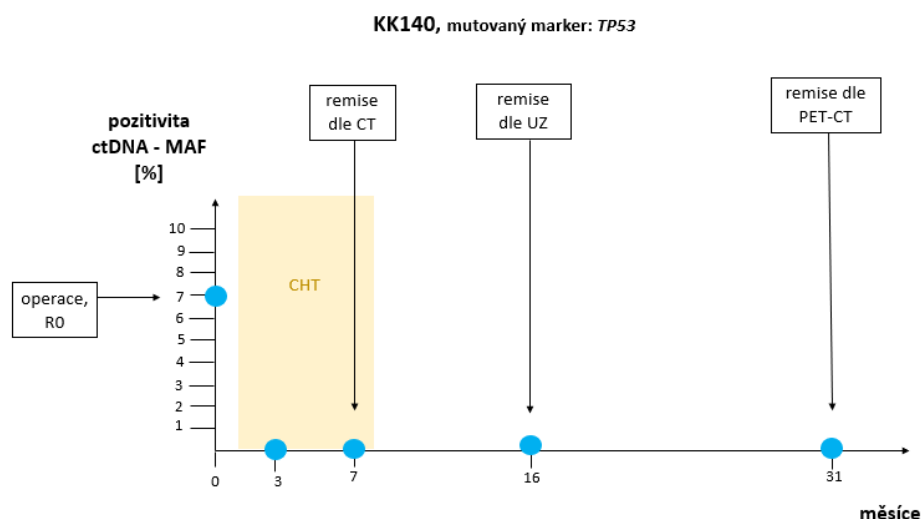
33 % (2/6). Další skupinou byli 3 pacienti s radikalitou operace R2b, viz kapitola 1.2.2.1, a všichni 3 byli ctDNA pozitivní i po operaci, což odpovídá záchytu 100 % (3/3), viz Tabulka 13.

Tabulka 13: Radikalita operace a přítomnost pooperační cirkulující nádorové DNA.

Číslo vzorku	Radikalita operace	Náběr PI (před operací)	Náběr PIII (po operaci)	Záchyt
KK92	R1	+	+	2/6 (33 %)
KK180	R1	+	-	
KK367	R1	+	-	
KK482	R1	+	+	
KK596	R1	+	-	
KK599	R1	+	-	
KK92	R2b	+	+	3/3 (100 %)
KK578	R2b	+	+	
KK696	R2b	+	+	

4.2.4 Follow-up pacientů

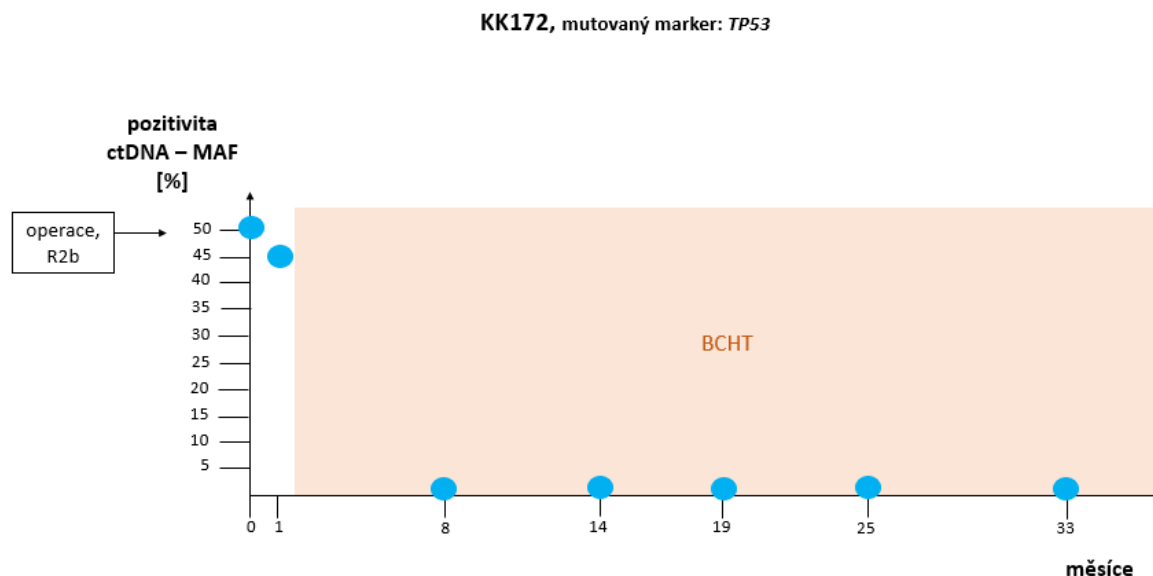
Kritéria dlouhodobého follow-upu splňovali 3 pacienti. U prvního pacienta (KK140) korelovala ctDNA v průběhu celého sledování, kdy měl pozitivní ctDNA před operací a všechny následné náběry ctDNA negativní při remisi (stav bez známek nádorového onemocnění) dle zobrazovacích metod. Grafické znázornění viz Obrázek 9.



Obrázek 9: Korelace klinického stavu a ctDNA u pacienta KK140.

CHT- chemoterapeutická léčba, CT- výpočetní tomografie, UZ-ultrazvuk, CEA- karcinoembryonální antigen, PET-CT - pozitronová emisní tomografie a výpočetní tomografie.

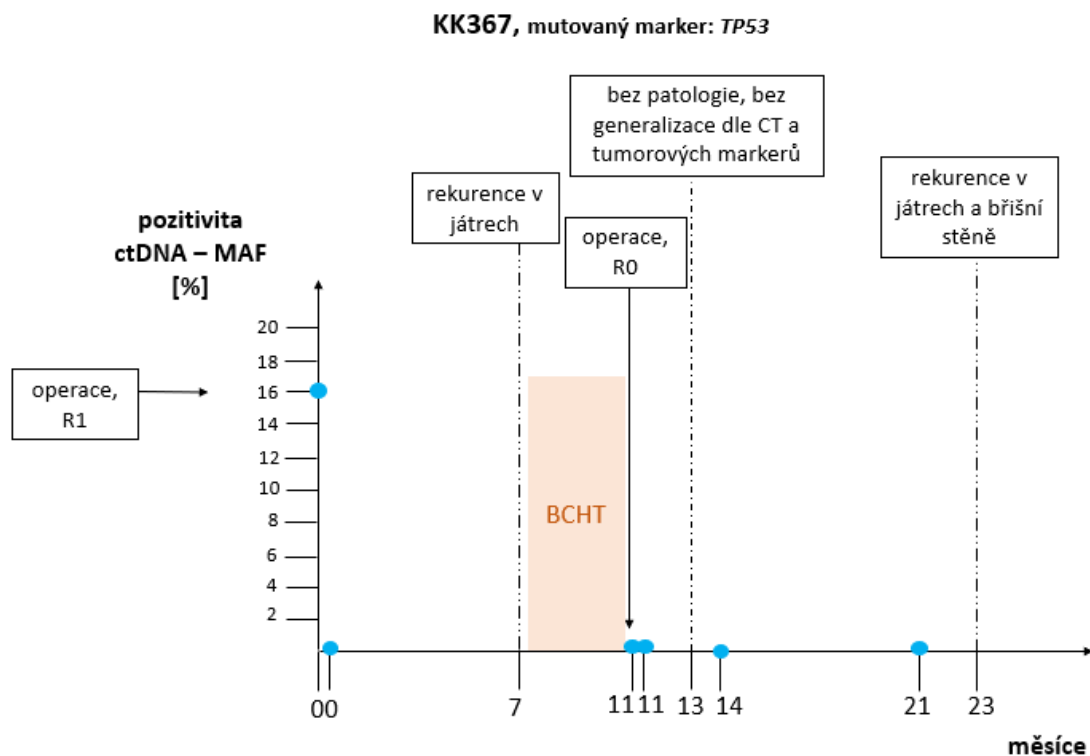
Druhý pacient (KK172) měl první 2 náběry plazmy ctDNA pozitivní a následně byl po zbytek follow-upu stále ctDNA negativní. Grafické znázornění viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Korelace klinického stavu a ctDNA u pacienta KK172.

BCHT-kombinovaná biologická a chemoterapeutická léčba.

Třetí pacient (KK367) měl pozitivní náběr plazmy jen před 1. operací, následné náběry plazmy byly všechny ctDNA negativní. Grafické znázornění viz Obrázek 11.



Obrázek 11: Korelace klinického stavu a ctDNA u pacienta KK367.

BCHT-kombinovaná biologická a chemoterapeutická léčba.

5 Diskuse

Optimalizace izolace a zachytu ctDNA

Prvním krokem bylo srovnat 6 izolačních protokolů a vybrat ten, díky kterému získám největší frakci ctDNA. K porovnání jsem vybrala 5 nových izolačních protokolů za použití 2 komerčních kitů přímo určených k izolaci cfDNA a standardně používaný izolační kit. Jednoznačně nejhorších výsledků jsem dosáhla za použití izolačních protokolů B1 a B2, u kterých byla ctDNA negativní u obou analyzovaných vzorků. U ostatních 4 izolačních protokolů byly výsledky, resp. procento mutované frakce, u obou vzorků srovnatelné, ale když vezmeme v potaz, že u onkologických pacientů není vždy možné odebrat dostatečné množství vzorku plazmy, je výhodnější izolovat z menšího vstupního objemu. Tím pádem zůstaly v úvahu 3 izolační protokoly (Q, N, A1) se vstupním objemem plazmy 0,5 ml, a jelikož ani jeden nevykazoval výrazně lepší výsledky, zůstaneme v rámci rutinní praxe u dosud používaného izolačního kitu, který je ze všech testovaných cenově nejvýhodnější a je již zavedený v naší laboratoři.

Co se týká optimalizace PCR reakce a zhodnocení postupů, které by mohly zabránit inhibici reakce, se na základě dosažených výsledků ukazuje jako nejvíce vhodná 1. varianta, tedy přečištění vzorku, díky kterému jsem zachytila mutaci u všech 3 původně „inconclusion“ vzorků. Při přečištění dochází zároveň i k naředění vzorku, a tím pádem ke snížení množství potenciální inhibiční látky navázané na DNA. Při pouhém naředění DNA do PCR reakce (4. varianta), jsem mutaci zachytila u 2 vzorků ze 3. Dle výsledků 3. varianty, kde jsem při izolaci cfDNA opakovala celou promývací sekvenci a v jednom případě pak zaznamenala ctDNA pozitivitu, se zdá, že vliv má i samotné promývání, ale v porovnání s celým procesem přečištění ne tak výrazný. Z toho vyplývá, že obecně naředění DNA sice hraje převažující roli, avšak samotné nestačí. Ukazuje se, že klíčovou roli mají ještě 2 faktory, a to vazba ctDNA na kolonku a její konečná eluce, což se vše spojuje právě při procesu přečištění.

Když se zaměříme na test polymeráz, podařilo se mi, na rozdíl od standardně používané polymerázy, u obou nově testovaných polymeráz získat amplifikační produkty, avšak v obou případech ctDNA negativní, což je v důsledku horší výsledek, jelikož by byly vzorky vyhodnoceny jako falešně negativní.

Analýza klinických vzorků

Získané procentuální zastoupení zachycených mutací v jednotlivých genech u vzorků nádorových tkání pacientů jsem porovnála s největší databází somatických mutací přítomných v lidských nádorech Cosmic. V mém souboru měly největší zastoupení mutace v genu *TP53* (48 %), což téměř přesně koresponduje s uvedenou databází, ve které byly mutace v tomto genu přítomné u 46 % analyzovaných vzorků. U ostatních genů se hodnoty procentuálního zastoupení mutací uvedené v databázi od mých výsledků lišily, a to nejvýrazněji u genu *APC*, který byl, dle databáze u kolorektálního karcinomu, mutovaný v 51 % vzorků, nicméně v mém souboru byl mutovaný jen v 19 % (URL2). Důvodem může být vyšetření kratšího úseku tohoto genu a obecně nižší počet analyzovaných vzorků.

Co se týká záchytu ctDNA, ten se obecně u pacientů s mCRC pohybuje od 60 % do 100 % v závislosti na použité metodě a analyzovaném genu, přičemž převážně ve studiích analyzují protoonkogeny s jasně danými lokusy výskytu mutací, a to většinou gen *KRAS*, který se nejlépe detekuje díky majoritnímu výskytu mutací ve 2 kodónech, na které se při analýze zaměřuje, a dále gen *BRAF* s nejčastější mutací V600E v exonu 15 (Spindler, Pallisgaard, Vogelius, & Jakobsen, 2012; Taly et al., 2013; Bettegowda et al., 2014; Thierry et al., 2014; Tie et al., 2015; Bachet et al., 2017; Thierry et al., 2017). Tumor supresorové geny se vyšetřují méně z důvodu možného výskytu velkého množství neznámých mutací kdekoli v sekvenci, které tak nelze detekovat metodami založenými na qPCR, u kterých je potřeba znát vyšetřovanou mutaci. Zde se odkrývá výhoda metody DCE, která detekci tumor supresorových genů společně se sekvenčními metodami umožňuje, jelikož se při ní detekuje jakákoli mutace přítomná v amplifikovaném úseku genu a není tedy třeba znát konkrétní sekvenci mutace. Výsledný záchyt ctDNA v mém souboru pacientů byl 65 %, tedy mírně nad spodní hranicí, ale je potřeba vzít v úvahu, že převažovaly vzorky s mutacemi v tumor supresorových genech, kde byl záchyt 60 % (6/10). V případě, že bych počítala pouze záchyt ctDNA u protoonkogenů, zvýšil by se na 71 % (5/7).

Stejně jako v jiných studiích jsem využila vlastností ctDNA jakožto dynamického markeru k ověření radikality provedené operace a ke včasnému zachycení progresu či rekurence onemocnění. Jelikož standardní zhodnocení radikality operace histologickým vyšetřením resekátu a zobrazovacími metodami či tumorovými markery není dostatečně citlivé, analýza ctDNA by tak mohla sloužit jako doplňkové vyšetření (Levy et al., 2012). Když se zaměříme na radikalitu operace R0 (v resekčním okraji se nenachází nádorové buňky) a R1 (přítomné

nádorové buňky v resekčním okraji) ukázalo se, že zvýšená pooperační hladina ctDNA může signalizovat přítomnost mikrometastáz v těle, a tím pádem větší riziko dřívější rekurence onemocnění. U takových pacientů je tedy vhodné zkrátit intervaly lékařských kontrol a případně indikovat adjuvantní léčbu (Grávalos et al., 2009; Schøler et al., 2017). Toto pozorování potvrdily výsledky studie Benešové et al. (2019), kteří jako první uvádí korelaci pooperační ctDNA s radikalitou resekce R1, kdy u pacientů s pozitivní ctDNA došlo k rekurenci v intervalu 3-7 měsíců po operaci, zatímco u pacientů s negativní ctDNA až po 7 a 22 měsících. Doba do rekurence u šesti pacientů, kteří byli součástí mé práce a měli radikalitu resekce R1 je v souladu s výsledky této studie. Celkem došlo k rekurenci u 5 z nich, přičemž u 2 ctDNA pozitivních pacientů došlo k rekurenci již po 3 měsících (v játrech) a po 3,5 měsících (v játrech a plicích). U ostatních 3 pacientů s ctDNA negativní plazmou po operaci došlo k rekurenci až po 7 měsících v játrech a peritoneu, 11 měsících v játrech a 22 měsících v játrech a plicích. Ve stejné studii dosáhli u radicality operace R2 100% záchytu ctDNA, což se shoduje s mým výsledkem, nicméně korelaci provedli na větší skupině pacientů (15), jenž byli předoperačně ctDNA pozitivní a všichni byli ctDNA pozitivní i po operaci (15/15). Ve druhé dostupné studii zaznamenali nižší záchyt, kdy ctDNA pozitivní byli po operaci 2 pacienti ze 3, což je 67 % (Norcic, Jelenc, Cerkovnik, Stegel, & Novakovic, 2016). Tento rozdíl je dán pravděpodobně použitou detekční metodou, přičemž DCE metoda, kterou využili ve studii Benešové má limit detekce 0,03 – 1 %, zatímco metoda použitá ve studii Norcice, tedy qPCR založená na alelově-specifické PCR má limit detekce 1 – 2 % (Rapisuwon, Vietsch, & Wellstein, 2016).

Pokud jde o samotný follow-up, již bylo ukázáno, že pozitivita ctDNA, respektive její hladiny, úzce souvisí s tumor burden a klinickým stavem pacienta (Levy et al., 2012; Benešová et al., 2019). Toto jsem pozorovala u 2 pacientů ze 3. První pacient (KK140) je typickým příkladem korelace, kdy byl předoperačně ctDNA pozitivní a po kurativní resekci R0 byl při dalším náběru po 3 měsících ctDNA negativní a zůstal tak po celou dobu sledování trvajícího necelé 3 roky, což odpovídalo jeho klinickému stavu, kdy byl dle zobrazovacích metod po celou dobu bez známek nádorového onemocnění. Druhý pacient podstoupil operaci s radikalitou resekce R2b, kdy mu v těle zůstaly metastázy v játrech, čemuž odpovídala pozitivita ctDNA v následujícím náběru. Poté mu byla nasazena léčba, při které jsem zaznamenala dlouhodobou negativitu. Zde může ctDNA sloužit jako prognostický marker (Lefebure et al., 2010). Přestože víme, že pacient měl přítomné ložisko v těle, tak nedocházelo k progresi onemocnění, jelikož byl stále ctDNA negativní. U třetího pacienta

byly výsledky zatíženy tím, že chyběly klíčové náběry plazmy při dvou rekurencích, takže se jsem nemohla zhodnotit, zdali by je ctDNA zachytila či nikoliv. Nicméně po druhé operaci byl náběr 2 měsíce před rekurencí ctDNA negativní, což může znamenat, že v tuto dobu ještě nebyla v těla přítomna nádorová tkáň, a tudíž ani ctDNA, nebo, že přítomna byla, ale ctDNA jsem nezachytila. To by mohlo být způsobeno sledovaným markerem, mutací v tumor supresorovém genu *TP53*, který je hůře detekovatelný.

S ohledem na velmi malý počet dlouhodobě sledovaných pacientů, nekompletní výsledky a větší pravděpodobnost falešných negativit z důvodu analýz hůře detekovatelného tumor supresorového genu *TP53*, který se ve všech třech případech vyskytoval, nelze brát tyto výsledky jako zcela relevantní.

6 Závěr

Největším úskalím ctDNA je její záchyt z důvodu velmi nízkého zastoupení v celkové volné cirkulující DNA. Proto jsem optimalizovala izolační postup, a to nejprve z hlediska výběru vhodného izolačního kitu, kde se nicméně neprokázalo, že by jiný komerční kit specializovaný na izolaci cfDNA záchyt ctDNA vylepšil, a dále z hlediska optimalizace PCR reakce, aby nedocházelo k častým inhibicím, a tím pádem k neúspěšným analýzám. V rámci toho jsem vyšetřovala 2 hypotézy:

1. samotná DNA, resp. látky, které jsou navázané na její strukturu, inhibují PCR reakci
Tato hypotéza se jeví jako pravděpodobnější. Na základě dosažených výsledků se ukázalo, že nejvhodnějším přístupem v případě inhibice reakce je celý izolační proces zopakovat v rámci přečištění.
2. DNA polymeráza není dostatečně účinná
Tuto hypotézu je potřeba dále rozvést a vyzkoušet ještě jiné DNA polymerázy, které by byly více specifické, než 2 testované.

V této práci jsem potvrdila přínos ctDNA jakožto vysoce specifického a citlivého nástroje k potvrzení radikality operace u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem, a to zejména u radikality resekce R2, a navíc její využití k predikci doby do rekurence onemocnění po provedení operace s radikalitou resekce R0 nebo R1. Za předpokladu zlepšení citlivosti její detekce by dále v klinické praxi mohla díky minimální invazivitě jejího vyšetření sloužit jako vhodný doplňkový nástroj při dlouhodobém sledování pacientů pro včasný záchyt rekurence či progresu onemocnění.

7 Seznam použitých zdrojů

7.1 Seznam citované literatury

Analytik Jena. (2016). PME free-circulating DNA Extraction Kit | Analytik Jena AG.

Retrieved August 31, 2020, from www.analytik-jena.com website:

<https://www.analytik-jena.com/products/kits-assays-reagents/kits-for-dnarna-extraction/pme-free-circulating-dna-extraction-kit/>

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F.

(2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691.

Bachet, J.-B., Bouche, O., Taïeb, J., Dubreuil, O., Garcia, M.-L., Meurisse, A., ... Laurent-

Puig, P. (2017). RAS mutations concordance in circulating tumor DNA (ctDNA) and tissue in metastatic colorectal cancer (mCRC): RASANC, an AGEO prospective multicenter study. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), 11509–11509.

Belic, J., Koch, M., Ulz, P., Auer, M., Gerhalter, T., Mohan, S., ... Heitzer, E. (2015).

Rapid Identification of Plasma DNA Samples with Increased ctDNA Levels by a Modified FAST-SeqS Approach. *Clinical Chemistry*, 61(6), 838–849.

Benešová, L. (2007). Využití moderních molekulárně-genetických metod v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových onemocnění (*PhD Thesis*).

Charles University in Prague.

Benešová, L., Hálková, T., Ptáčková, R., Semyakina, A., Menclová, K., Pudil, J., ...

Minárik, M. (2019). Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA. *World Journal of Gastroenterology*, 25(48), 6939–6948.

- Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 495–504.
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117–127.
- Bratman, S. V., Newman, A. M., Alizadeh, A. A., & Diehn, M. (2015). Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(6), 715–719.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Brunetto, G. S., Massoud, R., Leibovitch, E. C., Caruso, B., Johnson, K., Ohayon, J., ... Jacobson, S. (2014). Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *Journal of NeuroVirology*, 20(4), 341–351.
- Caldas, C. (2012). Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nature Biotechnology*, 30(5), 408–410.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954.
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA.

- Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586.
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., ... Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16368–16373.
- Dow, L. E., O'Rourke, K. P., Simon, J., Tschaharganeh, D. F., van Es, J. H., Clevers, H., & Lowe, S. W. (2015). Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*, 161(7), 1539–1552.
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Arbuck, S. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247.
- Elazezy, M., & Joosse, S. A. (2018). Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 370–378.
- Flamini, E., Mercatali, L., Nanni, O., Calistri, D., Nunziatini, R., Zoli, W., ... Amadori, D. (2006). Free DNA and Carcinoembryonic Antigen Serum Levels: An Important Combination for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(23), 6985–6988.
- Fong, S. L., Zhang, J. T., Lim, C. K., Eu, K. W., & Liu, Y. (2009). Comparison of 7 Methods for Extracting Cell-Free DNA from Serum Samples of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Chemistry*, 55(3), 587–589.
- Garlan, F., Laurent-Puig, P., Sefrioui, D., Siauve, N., Didelot, A., Sarafan-Vasseur, N., ... Zaanan, A. (2017). Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). *Clinical Cancer Research*, 23(18), 5416–5425.
- Ghiringhelli, F., Hennequin, A., Drouillard, A., Lepage, C., Faivre, J., & Bouvier, A.-M.

- (2014). Epidemiology and prognosis of synchronous and metachronous colon cancer metastases: A French population-based study. *Digestive and Liver Disease*, 46(9), 854–858.
- Grávalos, C., García-Escobar, I., García-Alfonso, P., Cassinello, J., Malón, D., & Carrato, A. (2009). Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 11(8), 526–533.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., ... White, R. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), 589–600.
- Hahn, A. W., Nussenzveig, R. H., Maughan, B. L., & Agarwal, N. (2019). Cell-free Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC): Current Knowledge and Potential Uses. *Kidney Cancer*, 3(1), 7–13.
- Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., ... Montesano, R. (1997). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Research*, 25(1), 151–157.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- Holch, J. W., Demmer, M., Lamersdorf, C., Michl, M., Schulz, C., von Einem, J. C., ... Heinemann, V. (2017). Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visceral Medicine*, 33(1), 70–75.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49–53.
- Hong, T. S., Clark, J. W., & Haigis, K. M. (2012). Cancers of the Colon and Rectum: Identical or Fraternal Twins? *Cancer Discovery*, 2(2), 117–121.

- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R.-D., & Knippers, R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research*, 61(4), 1659–1665.
- Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9530–9535.
- Kline, C., & El-Deiry, W. (2013). Personalizing Colon Cancer Therapeutics: Targeting Old and New Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals*, 6(8), 988–1038.
- Kloten, V., Rüchel, N., Bröchle, N. O., Gasthaus, J., Freudenmacher, N., Steib, F., ... Dahl, E. (2017). Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*, 8(49), 86253–86263.
- Koerkamp, B. G., Sadot, E., Kemeny, N. E., Gönen, M., Leal, J. N., Allen, P. J., ... D'Angelica, M. I. (2017). Perioperative Hepatic Arterial Infusion Pump Chemotherapy Is Associated With Longer Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases: A Propensity Score Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 35(17), 1938–1944.
- Lefebvre, B., Charbonnier, F., Fiore, F. D., Tuech, J. J., Pessot, F. L., Michot, F., ... Frebourg, T. (2010). Prognostic Value of Circulating Mutant DNA in Unresectable Metastatic Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, 251(2), 275–280.
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, 37(3), 646–650.
- Levy, M., Benesova, L., Lipska, L., Belsanova, B., Minarikova, P., Veprekova, G., ... Minarik, M. (2012). Utility of Cell-free Tumour DNA for Post-surgical Follow-up

- of Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Research*, 32(5), 1621–1626.
- Li, F. P., Fraumeni Jr., J. F., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., & Miller, R. W. (1988). A Cancer Family Syndrome in Twenty-four Kindreds. *Cancer Research*, 48(18), 5358–5362.
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3(2), 95–97.
- McCartney, B. M., & Näthke, I. S. (2008). Cell regulation by the Apc protein. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 186–193.
- Mori, Y., Nagse, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., ... Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Human Molecular Genetics*, 1(4), 229–233.
- Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., ... Rosenfeld, N. (2018). Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Science Translational Medicine*, 10(466), eaat4921.
- Mu, D.-Q. (2004). Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World Journal of Gastroenterology*, 10(4), 471.
- Müller, I., Beeger, C., Alix-Panabières, C., Rebillard, X., Pantel, K., & Schwarzenbach, H. (2008). Identification of Loss of Heterozygosity on Circulating Free DNA in Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients: Potential and Technical Improvements. *Clinical Chemistry*, 54(4), 688–696.
- Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C. W., Modlin, L. A., ... Diehn, M. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*, 20(5), 548–554.

- Norcic, G., Jelenc, F., Cerkovnik, P., Stegel, V., & Novakovic, S. (2016). Role of specific DNA mutations in the peripheral blood of colorectal cancer patients for the assessment of tumor stage and residual disease following tumor resection. *Oncology Letters*, 12(5), 3356–3362.
- Norgen Biotek. (2017). Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Cat. 55100) | Norgen Biotek Corp. Retrieved August 28, 2020, from norgenbiotek.com website: <https://norgenbiotek.com/product/plasmaserum-cell-free-circulating-dna-purification-mini-kit>
- Osborne, C. (2004). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist*, 9(4), 361–377.
- Oster, J., Parker, J., & Brassard, L. (2001). Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225(1–2), 145–150.
- Pérez-Barrios, C., Nieto-Alcolado, I., Torrente, M., Jiménez-Sánchez, C., Calvo, V., Gutierrez-Sanz, L., ... Romero, A. (2016). Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Translational Lung Cancer Research*, 5(6), 665–672.
- Polakis, P. (2012). Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a008052–a008052.
- Qiagen. (2020). QIAamp MinElute Spin Handbook - QIAGEN. Retrieved August 27, 2020, from www.qiagen.com website: <https://www.qiagen.com/au/resources/resourcedetail?id=8798cda6-4c55-4c0e-a302-966521c81aec&lang=en>
- Rapisuwon, S., Vietsch, E. E., & Wellstein, A. (2016). Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Computational and Structural Biotechnology*

Journal, 14, 211–222.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 402–412.

Samuels, Y. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, 304(5670), 554–554.

Samuels, Y., Diaz, L. A., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J. M., DeLong, L., Cheong, I., ... Velculescu, V. E. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*, 7(6), 561–573.

Schmidt, B., Weickmann, S., Witt, C., & Fleischhacker, M. (2005). Improved Method for Isolating Cell-Free DNA. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1561–1563.

Schmoll, H.-J., & Stein, A. (2014). Towards improved drugs, combinations and patient selection. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(2), 79–80.

Schøler, L. V., Reinert, T., Ørntoft, M.-B. W., Kassentoft, C. G., Árnadóttir, S. S., Vang, S., ... Andersen, C. L. (2017). Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(18), 5437–5445.

Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 295–308.

Sigma-Aldrich. (2017). GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit. Retrieved August 19, 2020, from lifescience.roche.com website:
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/genelute-mammalian-genomic-dna-miniprep-kit.html>

Sorber, L., Zwaenepoel, K., Deschoolmeester, V., Roeyen, G., Lardon, F., Rolfo, C., & Pauwels, P. (2017). A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(1), 162–168.

- Spindler, K.-L. G., Pallisgaard, N., Vogelius, I., & Jakobsen, A. (2012). Quantitative Cell-Free DNA, KRAS, and BRAF Mutations in Plasma from Patients with Metastatic Colorectal Cancer during Treatment with Cetuximab and Irinotecan. *Clinical Cancer Research*, 18(4), 1177–1185.
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), a007898.
- Sun, L. (2008). Colonography by CT, MRI and PET/CT combined with conventional colonoscopy in colorectal cancer screening and staging. *World Journal of Gastroenterology*, 14(06), 853.
- Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., Le Corre, D., Li, X., ... Laurent-Puig, P. (2013). Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical Chemistry*, 59(12), 1722–1731.
- Taniguchi, K., Uchida, J., Nishino, K., Kumagai, T., Okuyama, T., Okami, J., ... Kato, K. (2011). Quantitative Detection of EGFR Mutations in Circulating Tumor DNA Derived from Lung Adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7808–7815.
- Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*, 6(2), 31.
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3), 347–376.
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J. L., Guimbaud, R., Pezet, D., ... Ychou, M. (2017). Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection

- of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Annals of Oncology*, 28(9), 2149–2159.
- Thierry, A. R., Mouliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., ... Ychou, M. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature Medicine*, 20(4), 430–435.
- Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H. L., Roebert, J., Christie, M., ... Gibbs, P. (2015). Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 26(8), 1715–1722.
- Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Nilsen, T.-N., Mørk, P. C., ... Olsvik, Ø. (1992). Preparation and application of new monosized polymer particles. *Progress in Polymer Science*, 17(1), 87–161.
- Vatandoust, S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11767. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11767>
- Vlassov, V., Laktionov, P., & Rykova, E. (2010). Circulating Nucleic Acids as a Potential Source for Cancer Biomarkers. *Current Molecular Medicine*, 10(2), 142–165.
- Vukobrat-Bijedic, Z., Husic-Selimovic, A., Sofic, A., Bijedic, N., Bjelogrljic, I., Gogov, B., & Mehmedovic, A. (2013). Cancer Antigens (CEA and CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma. *Medical Archives*, 67(6), 397.
- Wittekind, C., Compton, C., Quirke, P., Nagtegaal, I., Merkel, S., Hermanek, P., & Sobin, L. H. (2009). A uniform residual tumor (R) classification. *Cancer*, 115(15), 3483–3488.
- Wojnarowski, J. M., Faivre, S., Herzig, M. C. S., Arnett, B., Chapman, W. G., Trevino, A. V., ... Juniewicz, P. E. (2000). Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA. *Molecular Pharmacology*, 58(5), 920–927.
- Yi, X., Ma, J., Guan, Y., Chen, R., Yang, L., & Xia, X. (2017). The feasibility of using

mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics. *International Journal of Cancer*, 140(12), 2642–2647.

Zavoral, M., Grega, T., & Suchánek, Š. (2016). Complications of colorectal cancer treatment. *Onkologie*, 10(1), 41–47.

7.2 Seznam internetových zdrojů

- URL1: Dušek, L., Zavoral, M., Májek, O., Suchánek, Š., Mužík, J., Pavlík, T., Šnajdrová, L., Gregor, J. Kolorektum.cz – Program kolorektálního screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2020. [cit. 2020-3-26]. Dostupný z: <http://www.kolorektum.cz>.
- URL2: COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [online]. Cancer browser, [cit. 2020-3-30]. Dostupný z: https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=large_intestine&ss=all&hn=all&sh=adenocarcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n.
- URL3: COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [online]. Gene view, [cit. 2020-3-30]. Dostupný z: https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?all_data=n&hn=all&in=t&ln=APC&sh=adenocarcinoma&sn=large_intestine&src=tissue&ss=all&wgs=off.
- URL4: NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Gene, [cit. 2020-3-30]. Dostupný z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>.
- URL5: COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [online]. Gene view, [cit. 2020-3-30]. Dostupný z:

https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?all_data=n&hn=all&in=t&ln=TP53&sh=adenocarcinoma&sn=large_intestine&src=tissue&ss=all&wgs=off.

URL6: NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Gene, [cit. 2020-4-9]. Dostupný z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>.

URL7: COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [online]. Gene view, [cit. 2020-4-9]. Dostupný z:

https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?all_data=n&hn=all&in=t&ln=KRAS&sh=adenocarcinoma&sn=large_intestine&src=tissue&ss=all&wgs=off.

URL8: NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Gene, [cit. 2020-4-9]. Dostupný z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>.

URL9: NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Gene, [cit. 2020-4-10]. Dostupný z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5290>.

URL10: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=23065458> [online]. [cit.2020-5-14]